



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2019

**Filipa Alexandra
Martins Ribeiro**

**Perfis de suscetibilidade de *Staphylococcus aureus*
e *Pseudomonas aeruginosa* em úlceras de perna**

DECLARAÇÃO

Declaro que esta dissertação é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2019

**Filipa Alexandra
Martins Ribeiro**

**Perfis de suscetibilidade de *Staphylococcus aureus*
e *Pseudomonas aeruginosa* em úlceras de perna**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Mestre Elisabeth Vieira da Costa, técnica superior de saúde – ramo laboratório, no Laboratório Avelab e do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, professor auxiliar com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

o júri

Presidente

Professora Doutora Sónia Alexandra Leite Velho Mendo Barroso
Professora Auxiliar C/ Agregação, Universidade de Aveiro

Doutora Sónia Cristina das Neves Ferreira
Professora Auxiliar Convidada, Universidade de Aveiro

Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves
Professor Auxiliar C/Agregação, Universidade de Aveiro

Agradecimentos

À Doutora Nádia Osório, minha professora de Licenciatura, mas que acompanhou de longe esta etapa, por toda a ajuda e compreensão na elaboração deste trabalho.

Às minhas amigas e companheiras de laboratório, Mané, Júlia, e principalmente à minha Margarida, por toda a entreaajuda, amizade, apoio nas alturas mais complicadas deste último ano.

Às amigas de sempre, Cláudia e Rita, por estarem sempre presentes e também aos meus amigos de coração, porque existe a presença de cada um deles na elaboração deste trabalho.

Aos meus pais por continuarem a apoiar-me e acompanhar-me na minha vida académica e profissional e por me incentivarem a nunca desistir dos meus objetivos.

E por fim, ao Hélio, a pessoa que acompanhou de mais perto todas as frustrações e conquistas destes últimos dois anos, por todo o companheirismo, amor e apoio incondicional. Obrigada do fundo do coração.

Palavras-chave

Úlceras de perna, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, resistência antimicrobiana

Resumo

Uma ferida é por definição uma perda da continuidade da pele ou tecido mole. Quando o processo fisiológico normal de cicatrização é alterado, estamos perante uma ferida crónica. As feridas crónicas tornaram-se um problema de saúde pública a nível mundial, quando associadas a outras comorbilidades e ao risco aumentado de infeção. Estima-se que cerca de 1 a 2% da população mundial experienciou uma úlcera de perna. As úlceras de perna, tal como as restantes feridas crónicas, quando associadas a infeções bacterianas causam as mais variadas consequências: atraso do processo de cicatrização, alteração na qualidade de vida dos doentes e familiares, aumento do tempo de internamento e em casos mais extremos, causar morte.

O objetivo deste trabalho consistiu em determinar o perfil de suscetibilidade dos isolados mais prevalentes em úlceras de perna na comunidade.

Foi realizado um estudo retrospectivo, reportando os dados recolhidos no laboratório Avelab entre Janeiro de 2016 a Dezembro de 2018. Este estudo incluiu 398 indivíduos com suspeita de infeção bacteriana em úlceras de perna. Foram realizados exames bacteriológicos de exsudados de úlcera de perna com avaliação microscópica do esfregaço (coloração de Gram) e exame cultural dos exsudados purulentos. O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) foi realizado pelo método de difusão em disco de Kirby-Bauer. Das 398 amostras analisadas obtiveram-se 325 amostras positivas para infeção e 73 negativas. Relativamente às amostras positivas, verificou-se maior prevalência de úlceras de perna no género masculino (53%). A média de idades no género masculino foi de 76, enquanto no género feminino foi de 72. Os microrganismos mais prevalentes e responsáveis pela infeção das úlceras de perna foram *S. aureus* (33,5%), *P. aeruginosa* (28,7%) e *Proteus mirabilis* (10%). No estudo de TSA para *S. aureus* verificou-se maior suscetibilidade a Trimetopim/Sulfametaxazol, Gentamicina e Tetraciclina; maior resistência foi verificada a Eritromicina e Penicilina. Em relação a *P. aeruginosa* verificou-se que apresentou suscetibilidade para a maioria dos antibióticos testados, com exceção de Ciprofloxacina que apresentou maior número de resistências.

A distribuição de úlceras de perna é semelhante entre géneros, surgindo maioritariamente em população idosa. Os perfis de suscetibilidade obtidos para *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram idênticos aos já descritos na literatura, com maior resistência de *S. aureus* aos beta-lactâmicos e *P. aeruginosa* às quinolonas. O uso combinado de antibióticos poderá ser mais eficaz no tratamento de úlceras de perna.

Keywords

Leg ulcers, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, antimicrobial resistance

Abstract

Wound is characterized as a loss of continuity of skin or tissue. When the normal physiological healing process changes, we are facing a chronic wound. Chronic wounds became a worldwide public health problem when associated with other comorbidities and to the increased risk of infection. It is estimated that about 1 to 2% of the world's population has experienced a leg ulcer. Leg ulcers, like other chronic wounds, when associated with bacterial infections can cause a large variety of consequences: delayed healing process, decrease and disorders in life quality of patients and families, increased length of treatments and, in most extreme cases, death. The aim of this study was to determine the susceptibility profile of the most prevalent isolates of leg ulcers in the community.

It was performed a retrospective study, reporting data collected at Avelab Laboratory's from January 2016 to December 2018. This study included 398 individuals with suspected bacterial infection in leg ulcers. The bacteriological procedures of leg ulcer's exudates were consisted of microscopic evaluation (Gram stain) and cultural examination of purulent exudates. Antimicrobial susceptibility testing was performed by the Kirby-Bauer disc diffusion method. From the 398 samples analyzed, 325 samples were positive for bacterial infection and 73 were negative. In relation to the positive samples, there was a higher prevalence of leg ulcers in men (53%). The average age in males was a 76, while in females it was 72. The most prevalent microorganisms responsible for leg ulcer infection were *S. aureus* (33.5%), *P. aeruginosa* (28.7%) and *Proteus mirabilis* (11,1%). In antimicrobial susceptibility study for *S. aureus*, there was a higher susceptibility to Trimetropim/Sulfametaxazole, Gentamicin and Tetracycline; highest resistance was found to Erythromycin and Penicillin. For *P. aeruginosa*, it was found that it was susceptible to the most of antibiotics tested, except for Ciprofloxacin, which presented higher number of resistances. The distribution of leg ulcers is similar between genders, appearing mostly in the elderly population. The susceptibility profiles obtained for *S. aureus* and *P. aeruginosa* were similar with the results already described in literature, with higher resistance of *S. aureus* to beta-lactams and *P. aeruginosa* to quinolones. The combined use of antibiotic can be more effective in leg ulcers treatment's.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC – amoxicilina / ácido clavulânico
CLED – do inglês *cistine lactose eletrolyte deficiente*
CMI – concentração mínima inibitória
DP – desvio-padrão
DM – diabetes *mellitus*
ECDC – do inglês *European Center of Disease Prevention and Control*
IPTB – índice de pressão tornozelo/braço
GS – gelose de sangue
LPS – lipopolissacarídeo
MDR – do inglês *Microorganism Multi-Drug Resistant*
MS – manitol salgado
MRSA – *S. aureus* resistente à metilina
OMS – organização mundial de saúde
THG – transferência horizontal de genes
TSA – teste de sensibilidade aos antibióticos
UA – úlcera arterial
UP - úlcera de perna
UPM – úlcera de perna mista
UV – úlcera venosa

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fases da cicatrização de feridas crônicas.	2
Figura 2: Úlcera venosa.....	4
Figura 3: Úlcera arterial	5
Figura 4: Mecanismos de resistência bacteriana	15

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Microbiota normal presente da pele.	8
Tabela 2: Moléculas produzidas por <i>P.aeruginosa</i> com poder patogénico.	11
Tabela 3: Principais grupos de antibióticos usados nas infeções para UP.	12
Tabela 4: Antibióticos e respetivas concentrações utilizadas no estudo segundo as normas de EUCAST para <i>Pseudomonaceae</i> e outros bacilos <i>Gram</i> negativo e para <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Tabela 5: Dados da população em estudo.	20

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ferida e o processo de cicatrização	1
1.1.1. Feridas que cicatrizam por primeira intenção – ferida cirúrgica	2
1.1.2. Feridas que cicatrizam por segunda intenção – ferida crónica	3
1.1.2.1 Úlcera de Perna	3
1.1.2.1.1 Úlcera venosa	4
1.1.2.1.2 Úlcera Arterial	4
1.1.2.1.3 Úlceras de Perna Mista	5
1.1.2.2 Prevalência das Úlcera de Perna	5
1.1.2.3 Prevenção para o aparecimento de Infecção na Úlcera de Perna	6
1.1.2.4 A infecção bacteriana em Úlcera de Perna	7
1.2. Microbiota da pele e microrganismos patogénicos associados	8
1.2.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
1.2.3. Biofilmes	11
1.3. Antimicrobianos para infecção na Úlcera de Perna	11
1.3.1. Penicilina e Cefalosporinas – Beta-lactâmicos	12
1.3.2. Antibióticos inibidores da síntese proteica – Aminoglicosídeos	13
1.3.3. Antibióticos inibidores da síntese de ácidos nucleicos – Quinolonas	13
1.3.4. Resistência a antibióticos	13
1.3.4.1 Mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos	14
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. População em estudo	17
3.2. Recolha dos exsudados de feridas	17
3.3. Análise microbiológica dos exsudados de ferida	18
3.3.1. Exame Cultural	18
3.3.2. Exame direto	18
3.4. Identificação bacteriana	18
3.5. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos – método de difusão em disco	19
4. RESULTADOS	20

4.1.	Caracterização da população em estudo	20
4.2.	Prevalência de Infecção em Úlceras de Perna	20
4.3.	Caracterização dos isolados bacterianos em Úlceras de Perna.....	21
4.4.	Perfis de suscetibilidade aos antibióticos	21
4.4.1.	Perfil de suscetibilidade de <i>S. aureus</i>	22
4.4.2.	Perfil de suscetibilidade de <i>P. aeruginosa</i>	23
5.	DISCUSSÃO	24
6.	CONCLUSÃO GERAL.....	30
7.	REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ferida e o processo de cicatrização

Ferida é definida como uma perda de continuidade da pele ou outro tecido, podendo resultar de traumatismo acidental, de um processo mórbido subjacente ou de uma técnica cirúrgica de causa iatrogénica ou não-iatrogénica (1,2).

No tratamento de feridas é importante a distinção entre feridas que cicatrizam por primeira intenção (feridas cirúrgicas) onde os tecidos podem estar expostos por minutos ou horas e feridas que cicatrizam por segunda intenção, onde ocorre perda de tecidos e aqueles que permanecem ficam expostos durante alguns dias ou semanas (1,2). A distinção entre o tipo de cicatrização é importante, uma vez que as feridas que cicatrizam por primeira intenção, geralmente apresentam tempos de cicatrização mais rápidos (processo fisiológico ocorre dentro de um intervalo de tempo definido), enquanto as feridas de segunda intenção, por envolverem processos fisiológicos de cicatrização complexos, são mais graves e apresentam tempos de cicatrização indeterminados (geralmente podem corresponder a semanas, meses ou anos) (3).

As alterações fisiopatológicas que ocorrem durante um processo de cicatrização de ferida estão relacionadas com a presença de vários fatores que prolongam a fase da inflamação, ou seja, libertação descontrolada e contínua de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos e neutrófilos presentes no leito da ferida que conduzem ao retardar da cicatrização (4,5). O processo de cicatrização da ferida envolve três fases: inflamatória (hemostasia e vasodilatação que promove quimiotaxia), proliferativa (ocorre epitelização, angiogénese, formação de tecido de granulação e deposição de colagénio) e maturação (deposição do colagénio de forma organizada) (5) conforme esquematizado na Figura 1.

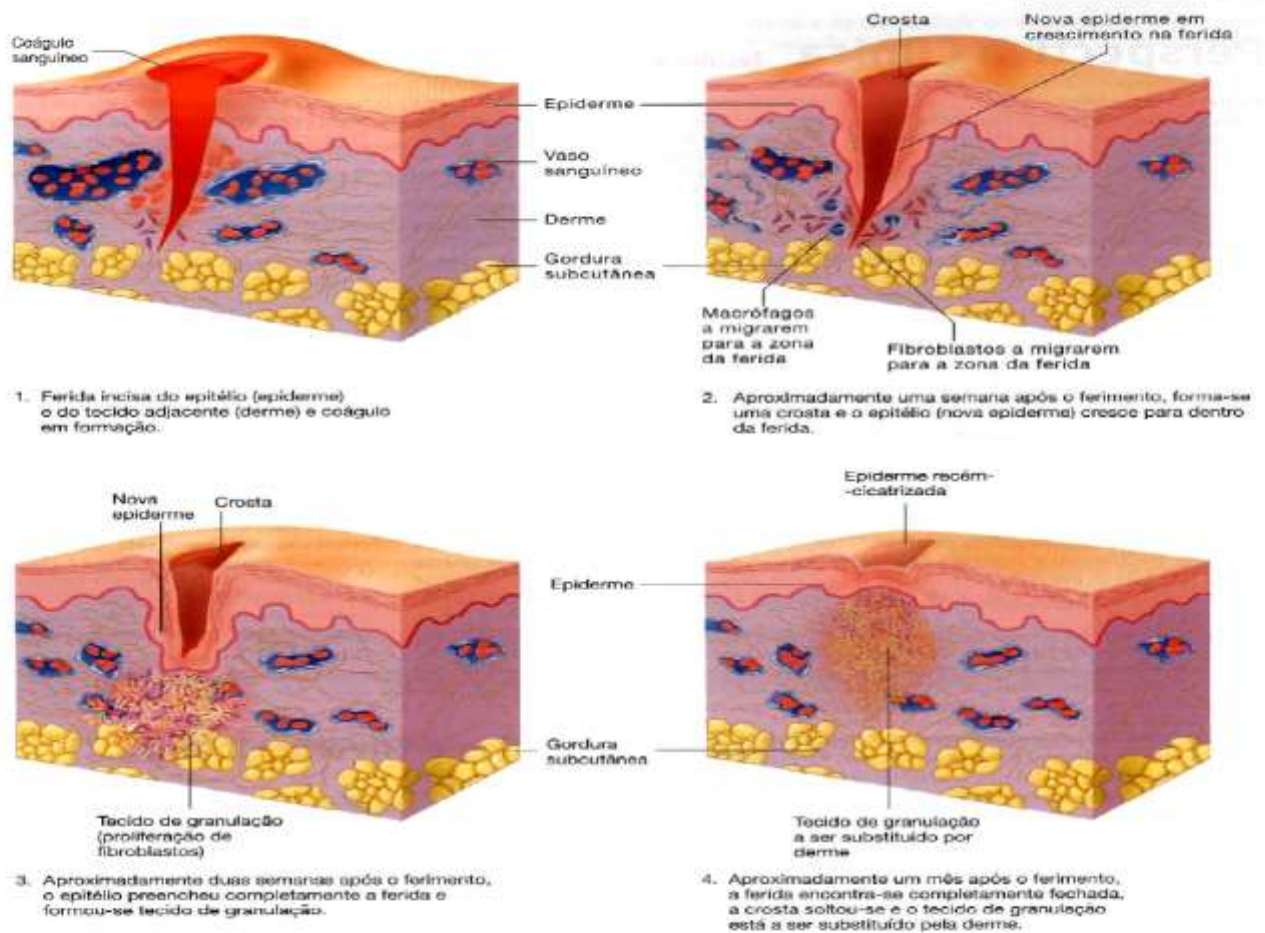


Figura 1: Fases da cicatrização de feridas crônicas. (Fonte: Seeley, R, Stephens, T, Tate, Philip. Anatomia & Fisiologia. 6ªEd. Lisboa. Lusodidacta, p.141. 2005)

1.1.1. Feridas que cicatrizam por primeira intenção – ferida cirúrgica

Uma ferida cirúrgica consiste num corte ou numa incisão geralmente efetuada com um bisturi durante uma cirurgia (6). As feridas cirúrgicas são geralmente fechadas através da aplicação de pontos, agafos ou de cola cirúrgica (6). Afetam a camada superficial da pele, as camadas profundas da fáscia ou os órgãos mais próximos. Podem ainda afetar articulações ou estruturas abdominais (6).

Os principais fatores responsáveis pelo aumento do risco de infeção na ferida cirúrgica são o número de bactérias, presença de tecido necrosado, hematomas, destruição de tecidos durante a intervenção, corpos estranhos, desnutrição, obesidade, patologia subjacente (ex: diabetes), imunodeficiência e infeções noutras zonas do corpo (1,2).

1.1.2. Feridas que cicatrizam por segunda intenção – ferida crónica

A ferida crónica resulta de uma falha no processo de cicatrização das feridas por não se reproduzir de uma forma quase imediata a integridade anatómica e funcional dos tecidos. Este tipo de feridas inclui úlceras vasculares, úlceras por pressão, feridas do pé diabético, queimaduras e feridas cirúrgicas em que a cicatrização da sutura se prolonga (1,2).

As feridas crónicas representam um grave problema mundial para a saúde pública com um elevado impacto a nível económico. Nos países desenvolvidos estima-se que 1 a 2% da população venha a adquirir uma ferida crónica durante a sua vida (1,4).

1.1.2.1 Úlcera de Perna

As úlceras de perna (UP) são classificadas como feridas crónicas, não só devido à sua longa duração de cicatrização, como também devido à sua elevada recorrência num curto espaço de tempo (7).

Não existe uma definição consensual de úlcera de perna. Alguns autores definem uma úlcera de perna como uma ulceração abaixo do joelho em qualquer parte da perna, incluindo o pé e que demora mais de seis semanas a cicatrizar (7,9). Outros autores não incluem as úlceras no pé, alegando que as causas associadas à lesão no pé são habitualmente diferentes da lesão na perna, com uma maior componente diabética e arterial do que as úlceras na perna. Uma definição mais clara consiste na perda circunscrita ou irregular da derme ou epiderme, que pode atingir o tecido subcutâneo e o subjacente na região abaixo do joelho (1).

Os principais fatores de risco associados ao aparecimento de UP passam por diversas patologias como doença arterial periférica, trombose venosa profunda, flebite, artrite reumatóide, vasculite, Diabetes *Mellitus*, cancro de pele, hiperlipidémia e hipertensão arterial. A subnutrição, obesidade, mobilidade reduzida, idade avançada, tabagismo assim como historial clínico de UP são também determinantes para o aparecimento deste tipo de feridas (10,12,13).

Existem diferentes categorias para as úlceras de perna, podendo estas serem úlceras venosas (UV), úlceras arteriais (UA) ou úlceras mistas (UPM) (7,9).

1.1.2.1.1 Úlcera venosa

A ulceração venosa da perna é uma lesão debilitante crônica que ocorre devido a trombose das veias profundas, função incompetente da bomba muscular gemelar ou insuficiência venosa crônica originando hipertensão (7,10,11).

O diagnóstico de úlceras venosas requer não só uma boa observação clínica, caracterizando-se geralmente como feridas superficiais, com periferia irregular e localizadas sobre proeminências ósseas e onde é comum a presença de tecidos de granulação e fibrina na base da úlcera (Figura 2) (12), mas também, outros procedimentos que forneçam dados fiáveis sobre a avaliação hemodinâmica da circulação venosa (7).



Figura 2: Úlcera venosa. (Fonte: Pugliese DJ. Infection in Venous Leg Ulcers: Considerations for Optimal Management in the Elderly. *Drugs and Aging*. 2016;33(2):87–96.)

De forma a confirmar a doença venosa tem sido sugerido a realização de exames complementares como o rastreio com Eco-Doppler dos membros inferiores e a pletismografia (7).

1.1.2.1.2 Úlcera Arterial

As úlceras arteriais (UA) estão associadas à aterosclerose, uma doença inflamatória e degenerativa dos grandes vasos, resultante da acumulação de placas de colesterol, células e tecidos degradados, estreitando progressivamente o lúmen do vaso, reduzindo o aporte de sangue arterial na região afetada (7,9,13).

Apresentam-se como sendo uma ferida circular profunda e necrótica, habitualmente localizada no pé e/ou áreas que sofrem maior ponto de pressão, cujas regiões mais comuns são o calcanhar, o maléolo e o tornozelo (Figura 3) (13).

A doença arterial na perna pode ser clinicamente avaliada através da observação da perna, incluindo a palpação dos pulsos ou através da utilização de uma medição objetiva do índice de pressão tornozelo/braço (IPTB) com recurso a um doppler manual (13).



Figura 3: Úlcera arterial. (Fonte: Vascular Society – The Vascular Society for Great Britain and Ireland, disponível em: https://www.vascularsociety.org.uk/patients/conditions/12/arterial_ulcer. Acedido em Agosto de 2019)

1.1.2.1.3 Úlceras de Perna Mista

As úlceras de perna mista (UPM) resultam da combinação de hipertensão venosa crónica com patologias arteriais periféricas, no entanto pouco se sabe sobre as características clínicas que possam auxiliar na definição deste tipo de ferida (7,14).

Num estudo realizado no Canadá em 2009, a apresentação clínica dos indivíduos foi indicativa de insuficiência arterial significativa, incluindo extremidades frias, pele brilhante, fissurada e com perda de elasticidade, reabastecimento capilar prejudicado e IPTB baixo (14).

Uma vez que estas úlceras são difíceis de tratar é importante conhecer qual o fator predominante, de forma a implementar o tratamento mais adequado. O edema necessita de ser controlado, mas a compressão forte surge contraindicada na presença de doença arterial grave (7).

1.1.2.2 Prevalência das Úlcera de Perna

A prevalência da UP tem sido alvo de muitos estudos, constatando-se que é um problema de saúde comum. Estima-se que as UP afetem entre 1% a 2% da população mundial, sendo mais frequentes em indivíduos com idade superior a 65 anos (1,9). Nos países

industrializados, espera-se que aproximadamente 1% dessa população apresente úlcera nos membros inferiores em algum momento da vida (1,9).

Num estudo realizado em Portugal (Distrito Norte) relacionado com úlceras de perna em ambiente de cuidados primários, constatou-se que em 151 indivíduos, registaram-se 72 feridas, que se traduziram numa prevalência de 16% (15). Num outro estudo, relacionado com úlcera de perna numa área urbana em Lisboa identificou-se uma prevalência de 1,41 por 1000, ou seja, 0,14% (1,15). No documento de consenso, 2009 em Espanha (18), a prevalência de úlceras nos membros inferiores era de 0,10 a 0,30%, sendo que para população com idade igual ou superior a 65 anos é duas vezes superior (15).

Relativamente à prevalência individual de cada tipo de ferida de perna, as UV são as mais frequentes e estão a aumentar a sua prevalência afetando cerca de 1% da população mundial e 3% das pessoas com mais de 80 anos em países desenvolvidos (4,10,11). São responsáveis por aproximadamente 75% de todas as úlceras de perna, sendo caracterizadas por vários fatores que dificultam e retardam a cura (7,9). Causam um grande impacto, quer a nível social, pessoal, psicológico e financeiro de um indivíduo e também um grande impacto económico para os sistemas de saúde (10).

As UA surgem seguidamente às UV, com uma prevalência de cerca de 10-20%. E por fim as UPM são responsáveis por aproximadamente 10% - 15% de todas as úlceras de perna (7). Estima-se que cerca de 25% das ulcerações dos membros inferiores podem apresentar complicações arteriovenosas coexistentes (14).

Prevê-se um aumento da prevalência de UP proporcional ao aumento da população idosa, devido à prevalência de obesidade e estilos de vida progressivamente sedentários (14).

1.1.2.3 Prevenção para o aparecimento de Infeção na Úlcera de Perna

A infeção da úlcera de perna deve-se à presença de microrganismos em replicação e com invasão de tecidos viáveis, provocando resposta do hospedeiro (15). Os principais sinais clínicos que revelam infeção da úlcera de perna são o aumento da quantidade de exsudado e alterações das suas características, odor, dor, alterações de coloração do tipo de tecido / leito da ferida, hipergranulação ou tecido de granulação friável, eritema, rubor, aumento da temperatura local, celulite, atraso / estagnação do processo de cicatrização (7,15).

Em muitos casos, a infeção pode ser prevenida a partir de uma correta identificação dos fatores de risco e aplicação dos princípios de controlo de infeção, como higienização das

mãos, utilização de equipamento de proteção pessoal, descontaminação dos equipamentos clínicos. (8,9,19,20).

A terapia compressiva permite a obtenção de bons resultados na cicatrização de UV, uma vez que reduz a pressão venosa, facilita o retorno venoso do sangue até ao coração aumentando a velocidade do fluxo nas veias profundas e diminui o edema reduzindo o diferencial de pressões entre os capilares e os tecidos (7).

O paciente com UA deve ser referenciado para a cirurgia vascular de forma a ser avaliado e eventualmente submeter-se à realização de uma revascularização por angioplastia ou cirurgia por *bypass*. É ainda prioritário o controlo sintomático, particularmente no que respeita à dor. O desbridamento pode estar contraindicado mas deve-se recorrer ao material de penso de acordo com os princípios locais de tratamento de úlceras. É importante ainda trabalhar os fatores de risco associados, como a hipertensão arterial, DM e hiperlipidémia. Os indivíduos com doença arterial não estão indicados para a terapia compressiva (7).

Na presença de sinais clínicos de infeção deve ser feita uma colheita do leito da ferida para exame microbiológico e instituída terapêutica antimicrobiana adequada (7).

Constituem ainda objetivos do tratamento assegurar uma gestão adequada do exsudado, desbridar o tecido desvitalizado ou necrosado, melhorar a perfusão tecidular, controlar a dor e tratar a causa subjacente da úlcera (7).

1.1.2.4 A infeção bacteriana em Úlcera de Perna

A infeção bacteriana é a complicação mais temida em qualquer tipo de ferida crónica, incluindo, úlcera de perna. É essencial o reconhecimento das consequências da infeção da UP na qualidade de vida dos utentes como os elevados custos que o tratamento da mesma implica (7, 19).

A chave para o apropriado tratamento da infeção na UP é a correta identificação dos sinais de infeção, mediante observação clínica. A infeção de uma ferida depende da patogenicidade e virulência dos microrganismos e na competência imunológica do hospedeiro, sendo determinada pela presença de sinais clínicos como eritema, dor, sensibilidade, calor, edema, celulite e abscesso / pus (sinais de Celsius). Em suma, a presença de infeção irá alongar o tempo de cicatrização de uma úlcera (19). Se a situação local não for tratada, a condição clínica do indivíduo pode agravar o indivíduo e levar ao aparecimento de sintomas de infeção sistémica (7,19,20).

1.2. Microbiota da pele e microrganismos patogênicos associados

Todas as úlceras crônicas estão altamente colonizadas com microrganismos comensais, sendo que num indivíduo com uma boa perfusão no membro, as bactérias comensais habituais não interferem no processo de cicatrização. A pele apresenta uma microbiota normal constituída por variadas espécies descritas na tabela 1.

Tabela 1: Microbiota normal presente da pele. [Fonte: (adaptado) Herceg, RJ; Peterson, L.R. Normal flora in health and disease. In: Shulmans S.T. et al. The biological and clinical basis of infectious diseases 5th. WB. Philadelphia: Saunders company, 1997. p.5-141]

Microrganismos ¹	Taxa de Prevalência (%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	85-100
<i>Staphylococcus aureus</i>	10-15
<i>Propionibacterium acnes</i> (difteroides anareóbios)	45-100
Corinebactérias (difteroides aeróbios)	55
<i>Candida</i> spp.	Comum
<i>Enterobacteriaceae</i>	Incomum
<i>Acinetobacter</i> spp.	25
<i>Moraxella</i> spp.	5-15

¹ Atualmente as prevalências correspondentes a cada um dos microrganismos referidos pode ser diferente.

Apesar das múltiplas respostas de defesa, a pele é altamente suscetível a muitas infecções causadas por bactérias residentes ou transitórias (flora comensal), especialmente na presença de feridas que expõem o tecido subjacente. Os patogênicos comumente envolvidos em infecções de pele são *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter* spp. e estafilococos coagulase-negativos, incluindo *Staphylococcus epidermidis* (26).

Em UP, *S. aureus* e *P. aeruginosa* desempenham o papel principal (25,26) com percentagens relativamente altas de prevalência (cerca de 93,5 e 52,2% dos pacientes com UP, respetivamente) (26). Estas bactérias expressam fatores de virulência capazes de contornar a antibioterapia aplicada e assim, conseqüentemente, levar ao aumento da resistência a antibióticos (25,26).

1.2.1. *Staphylococcus aureus*

As bactérias *S. aureus* são do género *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae* e são cocos gram-positivo, apresentam a capacidade de se agruparem em aglomerados ou cachos e são anaeróbicos facultativos imóveis, não possuem a capacidade de formar esporos e são catalase e coagulase positivas (26). A parede celular de *Staphylococcus* é constituída por peptidoglicano, polissacarídeos e proteínas capazes de conferir maior rigidez e proteger as bactérias, ao inibir a quimiotaxia e a fagocitose e também facilita a sua aderência a materiais sintéticos (26). Este género possui espécies presentes na microbiota normal de seres humanos, podendo estar presente na pele e mucosas como comensais (como por exemplo *Staphylococcus epidermidis*), mas também atuar como patogénicos oportunistas, causando infeções piogénicas, sendo a espécie *Staphylococcus aureus* o principal agente etiológico deste género (26,29).

Staphylococcus aureus pode produzir doenças a nível sistémico, incluindo infeções da pele, tecidos moles, ossos e no trato urinário (26). O alto potencial infeccioso do *S. aureus* não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande poder patogénico, que incluem enzimas – beta-lactamases, coagulases, hialuronidasas, catalases, DNAsas, lipases, proteases e esterases - e toxinas (alfa, beta e gama, leucocidina, a esfoliatina e as enterotoxinas) (28,29).

O mecanismo de invasão de *S. aureus* inicia-se com a aderência à pele ou à mucosa para, em seguida, romper as barreiras do epitélio, comprometendo estruturas de ligações intercelulares, como desmossomas e junções de aderência (28). Após a invasão do epitélio, *S. aureus* utiliza diversas estratégias para permitir a sua sobrevivência e proliferação no organismo hospedeiro: opsonização do complemento, a neutralização da fagocitose e a inibição das respostas imunes humoral e celular (28).

A capacidade de colonização e a patogenicidade de *S. aureus* são consequências dos seus fatores de virulência, os quais têm papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro. Esses fatores de virulência podem ser classificados em três categorias (28,29):

- Fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogénio, fibronectina, colagénio ou da enzima coagulase;

- Fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas, a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), a proteína A, lipases e polissacarídeos capsulares;
- Fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses, como toxinas (28,29).

1.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

As bactérias do género *Pseudomonas* pertencem à família *Pseudomonadaceae*. Caracterizam-se por serem bacilos gram-negativo retos ou ligeiramente curvos, aeróbios estritos, flagelados e oxidase positiva. *Pseudomonas aeruginosa* é um agente patogénico oportunista que pode causar variadas patologias como infeções no trato urinário, sistema respiratório, pele e tecidos moles, infeções oculares, ósseas e articulares e outras infeções sistémicas (28).

Uma característica específica da espécie é a sua capacidade de produzir vários pigmentos, sendo que o pigmento azul-esverdeado (piocianina) é geralmente encontrado em pacientes com queimaduras ou fibrose cística (28).

Pseudomonas aeruginosa é naturalmente resistente a vários tipos de antibióticos devido a uma barreira de permeabilidade proveniente da membrana exterior da bactéria – lipopolissacarídeo (LPS). Quando ocorre invasão destes bacilos na corrente sanguínea, o LPS desencadeia vários sintomas no hospedeiro, como febre alta e queda da pressão arterial (28,29).

Assim como *S. aureus*, *P. aeruginosa* apresenta um grande poder infeccioso devido à produção de moléculas com grande poder patogénico (29), conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2: Moléculas produzidas por *P.aeruginosa* com poder patogénico. [Fonte: (adaptado) Revista Virtual de Ciência. Infecções por *Pseudomonas aeruginosa*. Ciências News. Disponível:http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/revista_virtual/microbiologia/micro07.pdf. Acedido em julho 2019]

Moléculas com poder patogénico	Local / Mecanismo de ação
Polissacarídeo capsular	Aderência, antifagocítica
Fímbrias	Aderência
Proteases	Necrose, dano tecidual, inibição de anticorpos e neutrófilos
Endotoxinas	Febre, choque séptico
Elastase	Dano no endotélio vascular, inibição de neutrófilos
Exotoxina A e Exoenzima S	Inibição da síntese proteica, dano celular, necrose da derme
Leucocidina	Lise de leucócitos
Hemolisina	Tóxica para macrófagos alveolares
Fosfolipase C	Hemólise, dano tecidual
Pigmentos	Inibidores de certas bactérias

1.2.3. Biofilmes

Os biofilmes bacterianos ocorrem comumente na superfície de feridas, como UP, e contribuem para a ocorrência de inflamações crônicas, comprometendo o processo de cicatrização (4,5,19,26). Resultam da agregação de microrganismos com um elevado grau de organização, onde as bactérias formam comunidades estruturadas, coordenadas e funcionais. Estas comunidades biológicas encontram-se embebidas em matrizes poliméricas compostas por proteínas, lípidos e polissacarídeos (21,25). Uma das propriedades principais destes é o aumento da capacidade de resistência aos agentes antimicrobianos e químicos e às ações imunológicas do hospedeiro (19,25,26).

1.3. Antimicrobianos para infecção na Úlcera de Perna

Agentes antimicrobianos ou antibióticos são substâncias naturais, produzidas por microrganismos, ou por síntese química que inibem o crescimento bacteriano (efeito bacteriostático) ou o destroem (efeito bactericida) (28,29).

Um antimicrobiano ideal deve possuir uma ampla ação antibacteriana sobre uma grande variedade de microrganismos, ser microbicida, exercer a sua função sobre líquidos ou exsudados corporais de forma a não ser degradado por enzimas teciduais, não deve comprometer o sistema imunológico do hospedeiro nem produzir efeitos secundários graves nem episódios de hipersensibilidade alérgica, possuir características de absorção, distribuição e excreção que possibilitem obter rapidamente níveis plasmáticos microbicidas no sangue e tecidos, não induzir o aparecimento de microrganismos resistentes e ser produzido a um custo razoável (21,22).

Os antibióticos usualmente utilizados para o tratamento de UP podem ser agrupados em várias classes (7), conforme está descrito na tabela 3:

Tabela 3: Principais grupos de antibióticos usados nas infecções para UP. [Fonte (adaptado): Furtado K. Úlceras de Perna – Tratamento baseado na evidência. Nursing (Lond) [Internet].2003;15:35–42).

Antimicrobiano	Mecanismo de Ação
Beta-lactâmicos (Penicilinas e Cefalosporinas)	Antibióticos antiparietais (atuam a nível da síntese de peptidoglicano)
Aminoglicosídeos	Inibidores da síntese proteica (associam-se a alvos ribossomais)
Quinolonas	Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

Atualmente existe um crescente interesse na utilização de antissépticos locais na presença de infecção devido às resistências das bactérias aos antibióticos (7).

1.3.1. Penicilina e Cefalosporinas – Beta-lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos são agentes bactericidas, que inibem a última fase da síntese do peptidoglicano (fase parietal), principal constituinte da parede celular das bactérias. Esta classe de antibióticos está subdividida em seis grupos diferentes: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases (26,31).

As penicilinas atuam interferindo no desenvolvimento da parede celular bacteriana e ligações cruzadas. Neste grupo as ampicilinas e amoxicilinas são ativas contra determinados organismos gram-positivo e gram-negativo (7).

As cefalosporinas têm uma atuação semelhante à das penicilinas e têm um espectro de ação alargado (classificação em cinco classes: Cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a, 4^a e 5^a geração) tanto contra organismos gram-positivo como gram-negativo (7,26,31).

1.3.2. Antibióticos inibidores da síntese proteica – Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são bactericidas de rápida ação, que atuam ao nível da síntese proteica, bloqueando de forma irreversível as subunidades ribossomais, através da penetração deste na parede e membrana da célula bacteriana. Uma vez dentro da célula inibem a síntese proteica ao interagir com a subunidade 30S do ribossoma levando a erro na leitura do RNA mensageiro, provocando a lise das bactérias (26,31). São utilizados perante infeções por microrganismos multirresistentes (MDR) ativos contra microrganismos gram-negativo e gram-positivo (26,31).

Esta classe de antibióticos exhibe algumas vantagens terapêuticas a nível de estabilidade metabólica, largo espectro de ação antibacteriana, sinergismo com β -lactâmicos, tornando-os numa mais-valia no tratamento de doenças infecciosas (7).

1.3.3. Antibióticos inibidores da síntese de ácidos nucleicos – Quinolonas

As quinolonas atuam ao nível da inibição do enrolamento da dupla hélice do DNA, inibindo as enzimas envolvidas, tais como a DNA-girase e topoisomerase IV, impedindo, assim, o processo de transcrição e replicação do DNA bacteriano. Em bactérias gram-positiva a sua ação dá-se principalmente pela inibição da topoisomerase IV, enquanto em Gram-negativas, sobrepõe-se a ação sobre a DNA-girase (7,26,31).

1.3.4. Resistência a antibióticos

Considera-se que um microrganismo é MDR quando este é resistente a pelo menos 3 classes diferentes de antimicrobianos testados (25). As bactérias multiplicam-se rapidamente, sofrem mutações e podem trocar material genético entre linhagens da mesma espécie ou espécies diferentes (transferência horizontal de genes - THG) (31).

Atualmente, a resistência aos antibióticos aumentou drasticamente e é reconhecida como um grande desafio em saúde pública (31). Na União Europeia, a cada ano, cerca de 25 mil pacientes morrem devido a infeção por uma bactéria multirresistente, com um custo de 1,5 bilhão de euros para os serviços públicos de saúde (25).

O uso extensivo e muitas vezes inapropriado dos antibióticos, as más condições de higiene, fluxo contínuo de viajantes, aumento de pacientes imunodeprimidos e a demora no diagnóstico das infeções bacterianas são alguns dos fatores que tem contribuído para a extensão desta problemática (31).

É necessário o aparecimento de novas estratégias combinadas para prevenir o surgimento e disseminação de estirpes resistentes aos antibióticos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a manutenção de sistemas de vigilância, o uso racional de antibióticos e medidas de controlo de infeção, bem como esforços para desenvolver novos agentes antibacterianos (29,37).

1.3.4.1 Mecanismos bacterianos de resistência aos antibióticos

A resistência bacteriana aos antibióticos ocorre através de mecanismos intrínsecos ou adquiridos. O mecanismo intrínseco é uma característica específica de espécies bacterianas e é caracterizado por genes que ocorrem naturalmente no cromossoma. Esta resistência é consequência de processos adaptativos gerais que não estão associados necessariamente a uma determinada classe de antimicrobianos. Um dos principais mecanismos é a transferência vertical de genes das células mãe, para as células filhas (32).

A resistência adquirida é o principal mecanismo da resistência antimicrobiana, sendo resultado de uma pressão evolutiva específica do desenvolvimento de mecanismos de contra-ataque contra um agente antimicrobiano ou uma classe de antimicrobianos. Deste modo as populações bacterianas anteriormente suscetíveis a um antimicrobiano tornam-se resistentes (33). Desses mecanismos destacam-se: alterações das células bacterianas causadas por alterações genéticas cromossómicas e extra-cromossómicas (ex: plasmídeos), THG de resistência entre estirpes e espécies através dos processos de transformação, conjugação e transdução (33).

O conhecimento dos mecanismos bioquímicos e genéticos envolvidos na resistência bacteriana é de grande importância de maneira a compreender de que forma a bactéria pode desenvolver a resistência. Embora estes mecanismos variem de microrganismo para microrganismo, a resistência é causada por alguns fatores básicos representados na Figura 4. Estes fatores compreendem a inativação do antibiótico diretamente na molécula bioativa devido a alterações químicas, geralmente promovidas por enzimas bacterianas; modificação do local-alvo que leva à perda de sensibilidade ao antibiótico; alterações na

bomba de efluxo e da permeabilidade externa da membrana que promovem a redução da concentração do antibiótico sem sua modificação química. (33).

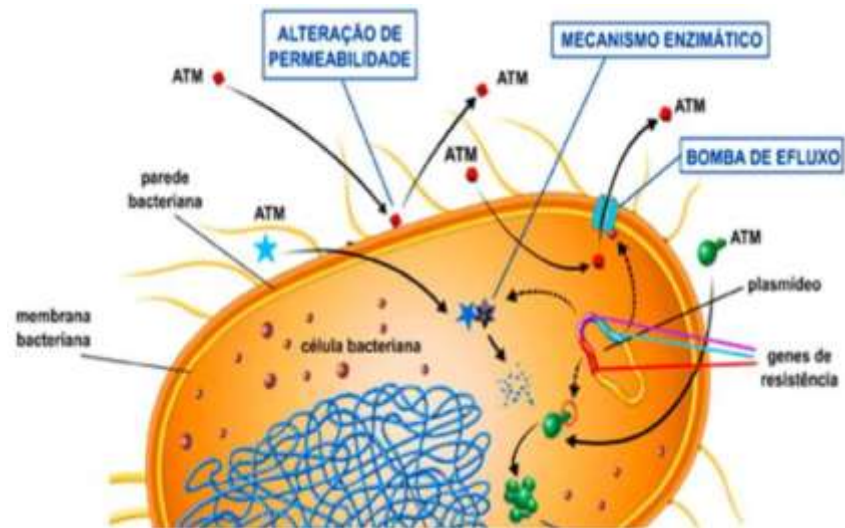


Figura 4: Mecanismos de resistência bacteriana. (Fonte: Castanheira B et al. Mecanismos de resistência a antibióticos. Diss Mestrado, Lisboa, Univ Lusófona Humanidades e Tecnol Fac Ciências e Tecnol da Saúde. 2013;42.

2. OBJETIVOS

Determinar os perfis de suscetibilidade dos microrganismos mais prevalentes em úlceras de perna na comunidade, com avaliação do género e idade dos utentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. População em estudo

A população em estudo correspondeu a 398 amostras de exsudados de feridas recolhidas através de uma zaragatoa em utentes em idade adulta da região de Aveiro, no Laboratório Central da Avelab – Laboratórios Médicos de Análises Clínicas. As amostras foram recolhidas no período compreendido entre Janeiro de 2016 a Dezembro de 2018.

3.2. Recolha dos exsudados de feridas

Antes de se proceder à recolha de amostra do exsudado de ferida é necessário ter alguns cuidados de higiene, nomeadamente lavar a superfície da ferida com soro fisiológico estéril, com posterior remoção dos tecidos necrosados ou desvitalizados.

As amostras foram recolhidas por profissionais de saúde competentes, com recurso a uma zaragatoa estéril a temperatura ambiente, sendo colhida uma amostra de exsudado do leito da ferida no local de infeção mais viável (zonas profundas da lesão com inflamação/infeção ativa). Após colheita, estas amostras foram condicionadas em recipientes próprios com meio de transporte com os devidos cuidados de assepsia (34, 35).

As amostras, após recolha, foram transportadas no interior de recipientes estéreis fechados e à temperatura ambiente (15-20°C até ao Laboratório Central onde foram posteriormente processadas, no laboratório de Microbiologia Clínica).

O seu processamento foi realizado num período máximo de 2 horas após a recolha. Quando não foi possível o seu processamento imediato, foram conservadas a uma temperatura de 4°C durante 24 horas, de forma a minimizar o crescimento microbiano.

3.3. Análise microbiológica dos exsudados de ferida

3.3.1. Exame Cultural

Realiza-se primeiramente o exame cultural, antes do exame direto/a fresco. A sementeira foi realizada com zaragatoa para criação do inóculo seguindo-se estrias múltiplas por esgotamento com ansa estéril.

Os meios utilizados são da marca *Biomérieux* e são preparados em laboratório segundo as recomendações do fabricante:

- Gelose de Sangue (GS)
- Cystine Lactose Eletrolyte Deficiente (CLED)
- Manitol Salgado (MS)
- Levine

3.3.2. Exame direto

Seguidamente ao exame cultural foi realizado o exame direto – observação microscópica (objetiva 10× e 40×, respetivamente) do esfregaço da amostra de exsudado de ferida, preparado com uma gota de soro fisiológico estéril e inóculo da amostra para contagem semi-quantitativa de células epiteliais, leucócitos e eritrócitos (sendo que a presença de leucócitos é indicadora sugestiva de infeção ativa). Por fim é realizada a coloração de Gram para classificação das células bacterianas.

3.4. Identificação bacteriana

Para identificação fenotípica dos isolados obtidos das amostras foram realizados os testes clássicos de identificação de acordo com as normas da OMS (36).

3.5. Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos – método de difusão em disco

Para estudo da suscetibilidade aos antibióticos recorreu-se ao método de difusão em disco, teste de *Kirby-Bauer*. O procedimento foi realizado em laboratório segundo as normas EUCAST (37), em que os antibióticos testados e respetivas concentrações constam da tabela 4.

Tabela 4: Antibióticos e respetivas concentrações utilizadas no estudo segundo as normas de EUCAST para *Pseudomonaceae* e outros bacilos Gram negativo e para *Staphylococcus aureus*.

Antibióticos testados para <i>P. aeruginosa</i>	Dose disco µg	Halo de inibição	
		S _≥	R<
Piperacilina-tazobactam	30-6	18	18
Cefepime	30	21	21
Imipenem	10	20	20
Meropenem	10	24	24
Aztreonam	30	15	15
Ciprofloxacina	5	26	26
Gentamicina	10	17	17
Amicacina	30	15	15
Tobramicina	10	16	16
Ceftazidime	10	17	17

Antibióticos testados para <i>S. aureus</i>	Dose disco µg	Halo de inibição	
		S _≥	R<
Penicilinas	1 unidade	26	26
Cefoxitina (screen)	30	25	25
Ciprofloxacina	5	21	21
Gentamicina	10	18	18
Eritromicina	15	21	18
Tetraciclina	30	18	18
Trimetropim- sulfametoxazol	23,25/1,25	17	17
Amoxicilina – ácido clavulânico	20/10	20	20

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da população em estudo

Foram estudados um total de 398 indivíduos com suspeita de infecção em úlcera de perna. Desses 398 indivíduos estudados, 186 corresponderam a utentes do género feminino cuja média de idades correspondeu a 72 anos de idade. Relativamente aos 212 indivíduos do género masculino estudados, a média de idades correspondeu a 76 anos de idade. Os resultados obtidos podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5: Dados da população em estudo.

	n (%)	Idade (média)
Feminino	186 (47%)	72
Masculino	212 (53%)	76
Total	398 (100%)	74

4.2. Prevalência de Infecção em Úlceras de Perna

No total dos 398 indivíduos estudados, foi verificado que 325 utentes apresentaram exames culturais positivos, sendo que 73 tiveram resultado negativo para isolados bacterianos patogénicos após a observação do exame cultural. Os valores mencionados estão representados na figura 5.

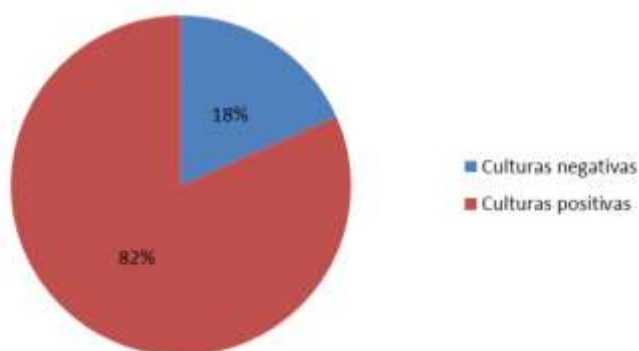


Figura 5: Resultados culturais positivos vs resultados culturais negativos

4.3. Caracterização dos isolados bacterianos em Úlceras de Perna

Das 325 amostras positivas, foram identificados os seguintes isolados bacterianos: *Citrobacter koseri*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecallis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella spp.*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Providencia alcalifaciens*, *Providencia rettgeri*, *Providencia spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, representados na figura 6. Dos microrganismos identificados, verificou-se maior destaque para as espécies *S. aureus* com uma prevalência de 33,5%, seguida de *P. aeruginosa* com uma prevalência de 28,7% e por fim, *P. mirabilis* com 11,1% de prevalência.

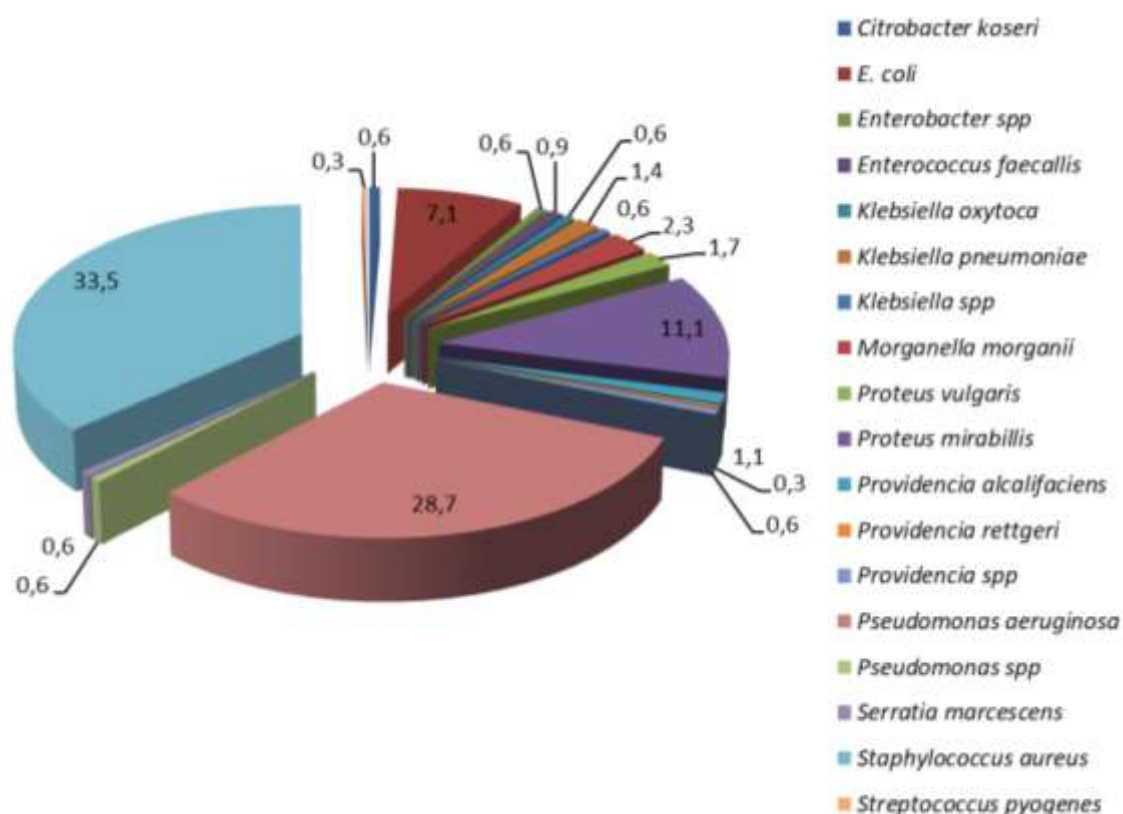


Figura 6: Espécies identificadas no estudo e respectivas taxas de prevalência.

4.4. Perfis de suscetibilidade aos antibióticos

Tendo em conta o maior número de isolados verificados nas amostras, procedeu-se ao estudo dos perfis de suscetibilidade de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Para os isolados de *S. aureus* foram testados antibióticos dos grupos Quinolonas (Ciprofloxacina),

Aminoglicosídeos (Gentamicina), Macrolídeos (Eritromicina), Tetraciclina, Sulfonamidas (Trimetropim/Sulfametaxazol) e Beta-lactâmicos (Amoxicilina/Ácido clavulânico, Penicilina e Cefalosporinas de 2º geração- Cefoxitina).

Relativamente ao estudo do perfil de suscetibilidade para *P. aeruginosa*, os antibióticos estudados foram dos grupos Beta-lactâmicos (Cefalosporinas de 3ª e 4ª geração – Ceftazidime e Cefepime respetivamente, Aztreonam, Imipenem, e Piperacilina/Tazobactam), Aminoglicosídeos (Amicacina, Gentamicina e Tobramicina) e Quinolonas (Ciprofloxacina).

4.4.1. Perfil de suscetibilidade de *S. aureus*

Após avaliação do perfil de suscetibilidade de *S. aureus* (n=118) relativamente aos antibióticos estudados, que se pode observar na figura 7, verificou-se que as maiores taxas de sensibilidade (aproximadamente 90%) corresponderam à utilização de Gentamicina (n=110), sendo que apenas oito isolados apresentaram resistência a este antibiótico; Tetraciclina (n=108) e apenas dez estirpes apresentaram resistência, e Trimetropim/Sulfametaxazol, com uma taxa superior a 95% (n=112) surgindo apenas seis isolados resistentes.

Por outro lado, os antibióticos que apresentaram taxas de resistência superiores a 50% corresponderam a Eritromicina (n=77) e a Penicilina (n=96).

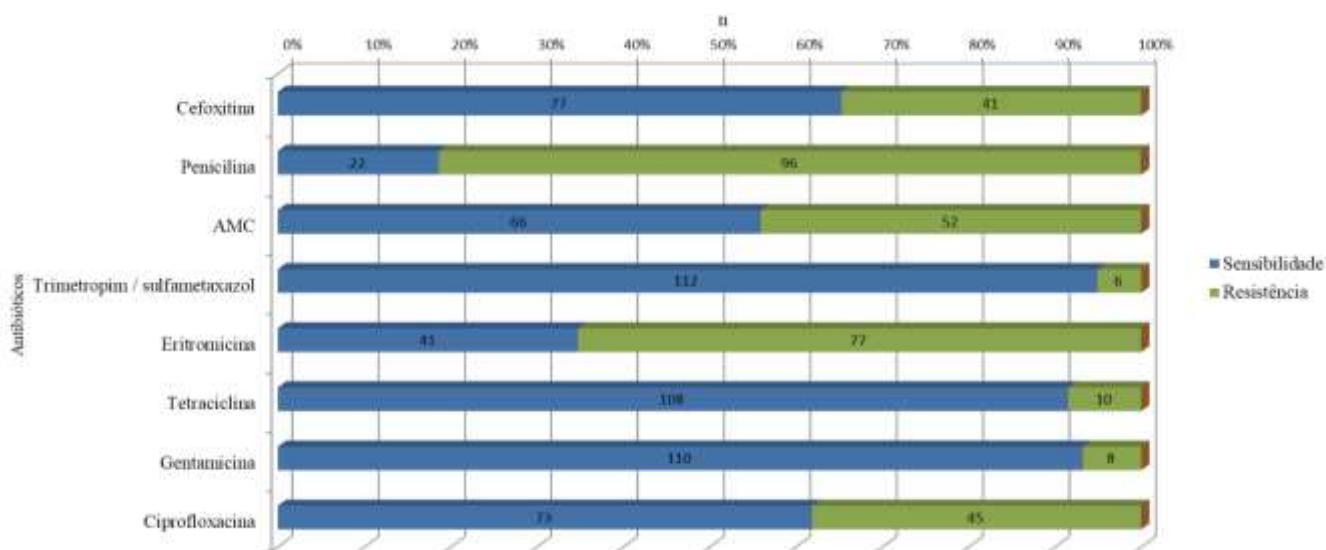


Figura 7: Perfil de resistência de *S. aureus* aos diferentes antibióticos.

4.4.2. Perfil de suscetibilidade de *P. aeruginosa*

Depois da análise de todos os isolados de *P. aeruginosa* (n=101) para os antibióticos selecionados (Figura 8), verifica-se que os perfis de sensibilidade foram muito semelhantes entre os antimicrobianos, com maior destaque para o Aztreonam (n=96) que obteve melhores resultados de sensibilidade (superior a 90%) contra cinco isolados que apresentaram resistência, e para o Cefepime (n=90) que não foi eficaz em onze isolados, sendo que ambos pertencem ao grupo dos Beta-lactâmicos.

Relativamente aos antibióticos com maior número de resistências, verificou-se que a Ciprofloxacina foi o fármaco que apresentou o maior número de isolados resistentes (n=30).

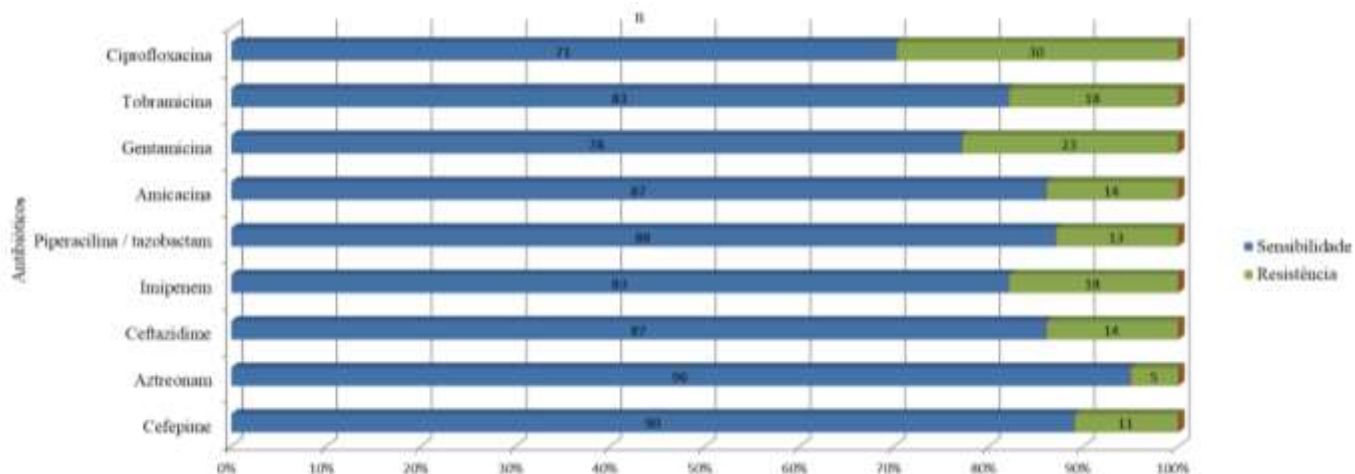


Figura 8: Perfil de resistência a *P. aeruginosa* aos diferentes antibióticos.

5. DISCUSSÃO

As feridas crónicas têm vindo a revelar-se nos últimos anos, um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial, causando problemas socioeconómicos tanto para as famílias como para cuidadores e serviços de saúde (9,10). Dentro da grande família das úlceras de perna, as úlceras venosas são as que apresentam maiores taxas de prevalência nas populações, sendo importante um estudo contínuo, não só deste tipo de feridas, como também das úlceras arteriais e úlceras mistas, que surgem seguidamente com grandes taxas de prevalência (7,9). Na presença de infeção bacteriana, as UP tornam-se mais complicadas de tratar, visto que a infeção bacteriana retarda e muito o processo de cicatrização das mesmas, afetando a qualidade de vida dos doentes, aumentando os tempos de internamento e, em casos mais graves, levar à morte do indivíduo (7,19).

Neste estudo, considerou-se pertinente a abordagem do género dos indivíduos afetados assim como a sua média de idades de forma a comparar com outros estudos realizados. Verificou-se que no total dos 398 indivíduos estudados, houve uma ligeira prevalência de UP em doentes do sexo masculino (n=212) em relação ao sexo feminino (n=186). Estes valores são um pouco contraditórios em relação ao que é descrito na literatura (17,38,39), já que é maior a prevalência de UP em mulheres (65% - 70%) (38-40) com um rácio 3:1 em relação aos homens (39). Contra as percentagens registadas neste trabalho, em alguns estudos internacionais, como por exemplo na Alemanha, houve uma maior prevalência de UP no género feminino (38); noutro estudo realizado por Pérez et al (39) em Espanha, verificou-se de igual modo uma maior prevalência de UP no género feminino (39). A prevalência deste tipo de patologia no sexo feminino é frequente devido ao facto de a esperança média de vida ser superior nas mulheres, ao aparecimento de varizes e alterações hormonais ocorridas ao longo da vida da mulher, como a gravidez e menopausa que são fatores agravados para a predisposição de úlceras de perna (41,42).

No que diz respeito à média de idades, neste trabalho as médias foram bastante próximas, o que era expectável, já que segundo a literatura, o aparecimento de UP está associado a pessoas idosas com idade superior a 65 anos (17,38) uma vez que a prevalência de UP vai aumentando com a idade, ocorrendo também a redução da capacidade regenerativa da pele

e da imunoproteção, assim como a presença de fatores de risco e patologias associadas (obesidade, DM, hipertensão arterial, doença venosa profunda, mobilidade reduzida) que potenciam o risco do aparecimento desta patologia em pessoas idosas (17,43,44).

Neste estudo verificou-se uma elevada taxa de culturas positivas (n=325), comparativamente à percentagem de culturas negativas (n=73). Estas amostras negativas podem dever-se a más condições de colheita e/ou transporte, o indivíduo poderá ter sido sujeito previamente a terapêutica antimicrobiana, ou efetivamente não apresentar qualquer tipo de infeção bacteriana (19).

Relativamente às amostras positivas para presença de isolados bacterianos das UP, foi registada uma grande variabilidade de microrganismos, com a identificação de 19 espécies diferentes, onde *S. aureus* e *P. aeruginosa* corresponderam a 50% dos isolados. Junka et al. (22), num estudo semelhante desenvolvido na Polónia, também identificaram algumas espécies em comum com as identificadas neste trabalho: *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Enterococcus* spp., *S. aureus*, *Klebsiella* spp., entre outras (19). Já no trabalho realizado por Bessa em 2013, as espécies predominantes foram exatamente as mesmas: *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *P. mirabilis*, podendo considerar-se que estes agentes microbianos são efetivamente os mais comuns neste tipo de infeções, devido às suas próprias características causadoras de infeção como a presença de fatores de virulência (nomeadamente a capacidade de formação de biofilmes) e a elevada capacidade de resistência a agentes antimicrobianos (16,17,19,20).

Na maioria das UP deste trabalho, os isolados mais prevalentes identificados corresponderam a *S. aureus* e *P. aeruginosa*. *S. aureus* é relatado em outros estudos como um dos microrganismos mais prevalentes (40-60% do total de microrganismos) em isolados de diferentes tipos de feridas. (19,45,46). Já *P. aeruginosa* foi o bacilo gram-negativo com maior prevalência, o que também está de acordo com outros estudos realizados (19,45,46). Sabe-se que estes dois microrganismos produzem fatores de virulência capazes de provocar grandes índices de patogenicidade (*S. aureus* produz coagulase, catalase, fator-aglutinante A e leucocidinas (27,28,47) e *P. aeruginosa*, elastase, exotoxinas), provocando infeção e a demora da cicatrização em feridas crónicas (19,29).

Os isolados bacterianos – *S. aureus* e *P. aeruginosa* - foram avaliados quanto à sua suscetibilidade aos antibióticos. Apesar do aumento da preocupação no que diz respeito à resistência das bactérias face à terapêutica antimicrobiana utilizada, o uso adequado de agentes antimicrobianos continua a ser recomendado quando se verificam evidências claras de infecção. (19,30,48).

S. aureus é um microrganismo oportunista que surge comumente nas regiões mais superficiais das UP (24). A característica patológica da infecção por *S. aureus* é a formação de lesões purulentas, causadas pela infiltração de neutrófilos na pele. Este microrganismo apresenta uma considerável sensibilidade a diversos antibióticos embora, ultimamente, o tratamento farmacológico seja complicado pela resistência aos antimicrobianos mais utilizados como a flucloxacilina. (exemplo: *S. aureus* resistente à meticilina-MRSA) (24).

Neste estudo, após a avaliação de vários grupos de antibióticos, verificou-se que o Trimetoprim / Sulfametoxazol (grupo das sulfonamidas), a Gentamicina (grupo dos aminoglicosídeos) e a Tetraciclina foram reportados como sendo boas opções terapêuticas antimicrobianas, devido à sua elevada sensibilidade, com maior sucesso terapêutico para o combate ao *S. aureus*, apresentando taxas de sensibilidade superiores a 90%. Estes resultados são concordantes com literatura já descrita, apoiando o uso deste tipo de antimicrobianos em infecções de UP para *S. aureus* (24,47).

Pelo contrário, o grupo dos Beta-lactâmicos (Amoxicilina/Ácido Clavulânico, Penicilina), com exceção da Cefoxitina (utilizada para deteção fenotípica de isolados MRSA quanto à sua resistência, não sendo utilizado como opção terapêutica), foram os que apresentaram taxas de resistência mais elevadas (19,30,48).

Através dos valores de resistência verificados para a Cefoxitina, foi possível concluir a presença de alguns isolados MRSA (n=41). Estes valores devem ser considerados no momento da escolha da antibioterapia, devido à resistência destes isolados a variados fármacos (48).

Para além do grupo dos beta-lactâmicos com altas taxas de resistência, verificou-se igualmente que os isolados *de S. aureus* apresentaram uma percentagem significativa de

resistência à Eritromicina. Num estudo semelhante realizado por Bessa et al, a taxa de resistência deste antimicrobiano aos isolados testados foi de 42% (19). Assim como num estudo realizado no Brasil por Perugini et al. (49), verificaram-se altos índices de resistência a este antimicrobiano, especialmente em isolados MRSA, concluindo-se que os macrolídeos não são uma opção viável no tratamento antibacteriano de UP, principalmente se estivermos perante MRSA, uma vez que estas estirpes começaram já a desenvolver resistência à ação destes fármacos (49).

Pseudomonas aeruginosa é igualmente, um patogénico oportunista presente nas regiões mais profundas do leito das UP, tem uma alta resistência antibiótica intrínseca e adquirida (27,29) que torna o seu tratamento desafiante (28,29). Uma UP infetada por *P. aeruginosa* é caracterizada por uma área afetada significativamente maior e com maior demora no processo de cicatrização (26).

Algumas estirpes de *Pseudomonas aeruginosa* são referenciadas como sendo MDR, tornando cada vez mais difícil encontrar antibióticos eficazes para o combate de infeções com este patogénico (29,48).

Neste estudo, a maioria dos isolados bacterianos apresentou taxas de suscetibilidade superiores a 80% face aos antimicrobianos testados.

Relativamente ao grupo dos beta-lactâmicos, o Aztreonam obteve uma taxa de suscetibilidade superior a 95%, sendo por isso, o mais eficaz no combate à infeção deste grupo e de todos os restantes antibióticos estudados. Seguidamente a este antibiótico surgem outras boas opções terapêuticas dentro do mesmo grupo dos beta-lactâmicos.

No grupo dos aminoglicosídeos, a Amicacina mostrou ser o antibiótico com a menor taxa de resistências, no entanto os restantes antibióticos apresentaram igualmente boas taxas de sucesso terapêutico.

Por outro lado, a Ciprofloxacina apresentou a maior taxa de resistência (aproximadamente 30%) de todos os antibióticos estudados.

Noutros estudos realizados, a resistência à Ciprofloxacina tem sido evidente, já que *P. aeruginosa* apresenta altos níveis de resistência às quinolonas, sendo que 20 a 35 % da

resistência está associada à Ciprofloxacina (28,29). Estes resultados podem ser resultado de má prescrição médica, excessiva e inadequada utilização de antimicrobianos por parte da população e devido ao facto deste antimicrobiano ser muito utilizado não só a nível hospitalar como também utilizado a nível comunitário (29,53). Já a Gentamicina está descrita como o antibiótico do grupo dos aminoglicosídeos com os níveis mais ativos de resistência, enquanto a Tobramicina e a Amicacina apresentam os níveis mais baixos de resistência (tal como verificado neste estudo) (28).

No entanto, existem vários estudos internacionais que apresentam resultados ambíguos face à antibioterapia comum utilizada: um estudo na Roménia revelou estirpes isoladas de UP resistentes à Piperacilina / tazobactam e Aztreonam (50), outro estudo, realizado na Malásia por Wong et al (51), encontrou estirpes de *P. aeruginosa* 100% suscetíveis apenas ao Imipenem e Meropenem, seguido de Ceftazidime (86%) e Amicacina, Aztreonam, Cefepime, Ciprofloxacina e Piperacilina / tazobactam (57% cada um) (51); por outro lado, um estudo realizado no Brasil por Gellati et al. (52), apenas 11,5% de resistência foi observada para Imipenem, e 25,2% e 28,5%, respetivamente, foram resistentes a antibióticos do grupo de aminoglicosídeos e à Ciprofloxacina (29,52).

Relativamente aos restantes antibióticos estudados, o facto de apresentarem, na sua maioria, boas taxas de sensibilidade com baixos valores de resistência verificados e, quando comparados com alguns estudos, as diferenças podem estar associadas ao perfil genético das estirpes estudadas. As estirpes podem ser diferentes de região para região, sendo que o estudo dos genes de resistência seria interessante na altura da escolha mais adequada ao tratamento (52).

Como está descrito em vários artigos, *S. aureus* e *P. aeruginosa* são responsáveis pela formação de biofilmes, o que dificulta muito o processo de cicatrização das feridas (4,29). Muitas vezes as opções terapêuticas utilizadas não são as mais eficazes devido à presença simultânea de vários microrganismos (4,5,28).

Neste estudo, verificamos que tanto para *S. aureus* como para *P. aeruginosa* a utilização de antibióticos combinados, Trimetoprim/Sulfametoxazol e Piperacilina/Tazobactam respetivamente, apresentaram favoráveis taxas de suscetibilidade para estes agentes

microbianos, o que nos leva a concluir que para uma terapia mais eficiente no tratamento de UP, o uso combinado de antibióticos poderá ser o mais indicado. Este facto é suportado pelas principais sociedades de feridas crónicas internacionais como a *European Wound Management Association*. (16,17).

6. CONCLUSÃO GERAL

O aumento da prevalência de úlceras de perna a nível global tem sido dramático. Estas feridas quando associadas a infeções bacterianas são mais difíceis de tratar, uma vez que temos de ter em conta outro problema subjacente às infeções bacterianas: o aumento de resistências aos antibióticos.

Neste estudo, verificou-se que a distribuição de UP por género é semelhante, surgindo essencialmente em pessoas idosas. Os microrganismos mais prevalentes acabaram por ser os mais comuns em feridas crónicas – *S. aureus* e *P. aeruginosa*, não se afastando dos resultados descritos na literatura já publicada.

Relativamente aos perfis de suscetibilidade, os resultados obtidos não foram muito diferentes dos já conhecidos, com maior perfil de resistência de *S. aureus* para beta-lactâmicos e as quinolonas para *P. aeruginosa*, embora para este último microrganismo as taxas de resistência tenham sido mais baixas, comparativamente a *S. aureus*.

Consideramos ainda que o uso combinado de antibióticos (Trimetoprim/Sulfametoxazol e Piperacilina /Tazobactam) sejam os mais recomendáveis na terapêutica para UP quando se verifica a presença de infeção pelos microrganismos referenciados acima.

É importante a realização de mais estudos de forma a avaliar os tipos de infeções presentes em úlceras de perna, e para além da realização de perfis de suscetibilidade, é fundamental a realização de perfis genéticos para se determinar quais as estirpes presentes na infeção e, assim, utilizar a terapia mais adequada de maneira a reduzir os tempos de cicatrização e evitar o uso de mais antibióticos.

Realizar estudos para a pesquisa de terapias alternativas aos antibióticos também consideramos ideal.

Por fim, salientar a importância da comunicação clínica entre profissionais de saúde – uma das maiores limitações deste estudo foi o facto de não termos tido acesso ao historial

clínico do utente, se era recorrente o aparecimento de UP ou se já tinha antecedentes de úlceras, assim como patologias associadas ao doente.

7. REFERÊNCIAS

1. Jesus, A et al. Prevalência e abordagem à pessoa com úlcera de perna. Diss Mestrado, Lisboa, Universidade Católica Portuguesa de Lisboa. 2014.
2. Wilson J. Controlo de Infecção na Prática Clínica. 2ª Edição. Elsevier Health Sciences; 2001. 209–226 p.
3. Isaac C, Ladeira P, Rêgo F, Aldunate J, Ferreira M. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. *revistadc* [Internet]. 2010; 89(3-4):125-31.
4. Santos S de LV, Martins MA, do Prado MA, Soriano JV, Bachion MM. Are there clinical signs and symptoms of infection to indicate the presence of multidrug-resistant bacteria in venous ulcers? *J Vasc Nurs*. 2017;35(4):178–86.
5. Tuttle MS. Association Between Microbial Bioburden and Healing Outcomes in Venous Leg Ulcers: A Review of the Evidence. *Adv Wound Care*. 2014;4(1):1–11.
6. Horan TC, Gaynes RP, Martone WJ, Jarvis WR, Emori TG. CDC Definitions of Nosocomial Surgical Site Infections, 1992: A Modification of CDC Definitions of Surgical Wound Infections. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;13(10):606–8.
7. Furtado K. Úlceras de Perna – Tratamento baseado na evidência. *Nursing (Lond)* [Internet]. 2003;15:35–42.
8. Pan W, Drost JP, Basson MD, Bush TR. Skin perfusion responses under normal and combined loadings: Comparisons between legs with venous stasis ulcers and healthy legs. *Clin Biomech* [Internet]. 2015;30(10):1218–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinbiomech.2015.08.001>.
9. Tavares APC, Sá SPC, Oliveira BGRB de, Sousa AI. Quality of life of elderly patients with leg ulcers. *Esc Anna Nery* [Internet]. 2017;21(4). Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1414.
10. Franks P, Barker J, Collier M, Al. E. Managemetn of pacientes with venous leg ulcers: Challenger and current best practice. *J Wound Care*. 2016;25(6):1–67.
11. Albuquerque G et al. Terapia compressiva de curta tração no tratamento da úlcera de perna: eficácia na dor, qualidade de vida e custo de tratamento. Diss Mestrado, Viseu, Escola Superior de Saúde de Viseu; 2017.
12. Werchek S. Diagnosis and treatment of venous leg ulcers. *Nurse Pract*. 2010;35(12):46–53.
13. Moreira MMR, Augusto FDS, Blanes L, Gagnani A, Ferreira LM. Qualidade de

- vida e capacidade funcional em pacientes com úlcera arterial. *Av en Enfermería*. 2016;34(2):170–80.
14. Marin JA, Woo KY. Clinical Characteristics of Mixed Arteriovenous Leg Ulcers. *J Wound, Ostomy Cont Nurs*. 2017;44(1):41–7.
 15. Vaz, A. Prevalências de feridas num distrito do Norte de Portugal, Diss Mestrado, Porto, Universidade Católica Portuguesa. 2014.
 16. European Wound Management Association. “Identifying criteria for wound infection” Position document. 2005
 17. European Wound Management Association. “Management of wound infection” Position document. 2006
 18. Conferencia nacional de consenso sobre úlceras de la extremidad inferior p. 1:d12. Documento de Consenso. 2009
 19. Bessa LJ, Fazii P, Giulio M Di, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. 2013;1–6.
 20. Pugliese DJ. Infection in Venous Leg Ulcers: Considerations for Optimal Management in the Elderly. *Drugs and Aging*. 2016;33(2):87–96.
 21. Silva, J. Importância da formação de biofilmes nas infeções associadas a biomateriais. Diss Mestrado, Porto, Universidade Fernando Pessoa. 2015
 22. Junka A, Wojtowicz W, Ząbek A, Krasowski G, Smutnicka D, Bakalorz B, et al. Metabolic profiles of exudates from chronic leg ulcerations. *J Pharm Biomed Anal*. 2017;137(16):13–22.
 23. Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco OL. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol* [Internet]. 2017;73(3):710–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-016-0867-9>
 24. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio UF, Caroleo B, et al. Chronic wound infections: The role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(5):605–13.
 25. Wolcott RD, Hanson JD, Rees EJ, Koenig LD, Phillips CD, Wolcott RA, et al. Analysis of the chronic wound microbiota of 2,963 patients by 16S rDNA pyrosequencing. *Wound Repair Regen*. 2016;24(1):163–74.
 26. Almeida, M, Mendonça, R, Freitas, M, Vandesmet, L. *Staphylococcus Aureus*.

Mostra Científica em Biomedicina, Volume 1, Número 01, Jun. 2016

27. Tong SYC, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2015;28(3):603–61.
28. Rahim K, Saleha S, Basit A, Zhu X, Ahmed I, Huo L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* as a powerful biofilm producer and positive action of amikacin against isolates from chronic wounds. Jundishapur J Microbiol. 2017;10(10).
29. Georgescu M, Gheorghe I, Curutiu C, Lazar V, Bleotu C, Chifiriuc MC. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. BMC Infect Dis [Internet]. 2016;16(1):3–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-1396-3>
28. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control. 2006;34(5 SUPPL.).
29. Meyer E, Gastmeier P, Deja M, Schwab F. Antibiotic consumption and resistance: Data from Europe and Germany. Int J Med Microbiol [Internet]. 2013;303(6–7):388–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.04.004>
30. Rosa, J. Antibióticos, bases, conceitos e fundamentos essenciais para o profissional de saúde. Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC. 2011 <http://repositorio.unesc.net/handle/1/714>
31. Guimarães DO, Da Silva Momesso L, Pupo MT. Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agents. Quim Nova. 2010;33(3):667–79.
32. Wright GD. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. Adv Drug Deliv Rev. 2005;57(10):1451–70.
33. Castanheira B et al. Mecanismos de resistência a antibióticos. Diss Mestrado, Lisboa, Univ Lusófona Humanidades e Tecnol Fac Ciências e Tecnol da Saúde. 2013;42.
34. European Pressure Ulcer Advisory Panel. Pressure Ulcer Treatment Guidelines. Oxford, England: EPUAP, 2014. Disponível em: <http://www.epuap.org/wp-content/uploads/2016/10/portuguese-quick-reference-guide-jan2016.pdf>
35. European Pressure Ulcer Advisory Panel. Prevention and treatment of pressure ulcers: quick reference guide. Washington DC: NPUAP,2009
36. Vandepitte, Verhaegen, Engbaek, Rohner, Piot H. Basic Laboratory Procedures in

- Clinical Bacteriology [Internet]. WHO Library Cataloguing. 2003. Available from: <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s16536e/s16536e.pdf>
37. EUCAST. European Society of Clinical Microbiology and Infections Diseases. <https://www.eucast.org>
 38. Heyer K, Herberger K, Protz K, Glaeske G, Augustin M. Epidemiology of chronic wounds in Germany: Analysis of statutory health insurance data. *Wound Repair Regen.* 2016;24(2):434–42.
 39. Berenguer Pérez M, López-Casanova P, Sarabia Lavín R, González de la Torre H, Verdú-Soriano J. Epidemiology of venous leg ulcers in primary health care: Incidence and prevalence in a health centre—A time series study (2010-2014). *Int Wound J.* 2019;16(1):256–65.
 40. Nelzen O, Bergqvist D, Lindhagen A, Hallbook T. Chronic leg ulcers: an underestimated problem in primary health care among elderly patients. *J Epidemiol Community Health.* 1991; 45:184-7.
 41. Carmel J. Venous ulcers. In: Bryant RA, Nix DP. *Acute and chronic wounds: current management concept.* 4th ed. St. Louis Missouri: Elsevier; 2012. p. 204-26
 42. Passadouro R, Sousa A, Santos C, Costa H, Craveiro I. Artigo Original Características e Prevalência em Cuidados de Saúde Primários das Feridas Crônicas. *Rev da Soc Port Dermatologia e Venereol.* 2016;74(November 2015):45–51.
 43. Jc D, Land L, Evans D, Peinemann F. Negative pressure wound therapy for treating leg ulcers (Review) summary of findings for the main comparison. 2015;(7).
 44. Pestana S, Nunes, L. Prevalência da Úlcera de Perna nos Utentes da Unidade de Saúde de Azeitão. *Revista Percursos* n13. 2009; (Julho-Setembro 2009): 31-36.
 45. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA. Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 2006;3:225–31.
 46. Korber A, Schmid EN, Buer J, Klode J, Schadendorf D, Dissemond J. Bacterial colonization of chronic leg ulcers: current results compared with data 5 years ago in a specialized dermatology department. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2010;24:1017–25.

47. Magalhães V, Amélia M, Maciel V, Rabelo MA. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolates obtained from skin and soft tissue infections of outpatients from a university hospital in Recife -PE , Brazil *. 2012;87(6):857–61.
48. Amin RM, Bhayana B, Hamblin MR, Dai T. Antimicrobial blue light inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* by photo-excitation of endogenous porphyrins: In vitro and in vivo studies. *Lasers Surg Med*. 2016;48(5):562–8.
49. Perugini E, Perugini VH, Rúbia A, Ferreira M, Oliveira CF De, et al. Tendência de resistência entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* em um hospital universitário do norte do Paraná de 2002 a 2011. 2015;275–82.
50. Mihai MM, Holban AM, Giurcăneanu C, Popa LG, Buzea M, Filipov M, et al. Identification and phenotypic characterization of the most frequent bacterial etiologies in chronic skin ulcers. *Rom J Morphol Embryol*. 2014;55:1401–8.
51. Wong SY, Manikam R, Muniandy S. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria from acute and chronic wounds in Malaysian subjects. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9:936–44.
52. Gelatti LC, Bonamigo RR, Becker AP, Eidt LM, Ganassini L, d’Azevedo PA. Phenotypic, molecular and antimicrobial susceptibility assessment in isolates from chronic ulcers of cured leprosy patients: a case study in Southern Brazil. *An Bras Dermatol*. 2014;89:404–8.
53. ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://ecdc.europa.eu/en/home>