

CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIGUAIRACÁ
INSTITUTO SUPERIOR DE ENSINO
BACHARELADO EM FARMÁCIA

**ANÁLISE DE CEPAS ISOLADAS DE FERIDAS CRÔNICAS EM TRATAMENTO
COM TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDa)**

GUARAPUAVA

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida, e pelas experiências que vivenciei nos últimos anos, as quais proporcionaram grande crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a toda a minha família pelo apoio. Em especial aos meus pais, Viviane e Ademir, e minha irmã, Amanda. Faltam-me palavras para agradecer tudo que fizeram e fazem por mim. Vocês se dedicaram muito para que esse sonho fosse possível. Durante esse período, me incentivaram e me amaram incondicionalmente, sendo o meu principal alicerce. Essa conquista dedico a vocês!

A minha namorada e melhor amiga, Maria Natália, que sempre esteve do meu lado, me incentivando e apoiando em todos os momentos.

Aos amigos que conquistei durante esse período, pelas trocas de conhecimento e pelo companheirismo, vocês tornaram esse processo mais leve e divertido.

Aos professores do Centro Universitário UniGuairacá. Em especial, aos professores do Colegiado de Farmácia, por todo conhecimento repassado, terei orgulho em dizer que vocês fizeram parte da minha formação.

A minha orientadora, Tatiana Herrerias, agradeço imensamente por todo apoio e incentivo no decorrer do curso, e também por me orientar com tanta paciência e maestria na elaboração deste trabalho. Foi um privilégio ter você como professora e orientadora. Tenho uma enorme admiração pela pessoa e pela profissional que você é.

A todos os membros do grupo de pesquisa em terapia fotodinâmica, pela oportunidade de participar do projeto. Com vocês tive experiências incríveis que foram muito importantes para o meu crescimento, as quais jamais esquecerei. Cris e Fernando, minha gratidão a vocês que ajudaram em toda a parte prática do trabalho, todo esse processo teria sido muito mais difícil e turbulento sem vocês.

Agradeço imensamente aos pacientes que aceitaram participar do estudo, pois sem a colaboração deles, a elaboração desse trabalho não seria possível.

A todos que contribuíram de alguma forma para a elaboração desse trabalho. Minha eterna gratidão.

ANÁLISE DE CEPAS ISOLADAS DE FERIDAS CRÔNICAS EM TRATAMENTO COM TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDa)

Igor Cesar Schreiner ¹

Tatiana Herrerias ²

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo identificar e determinar o perfil de susceptibilidade de isolados bacterianos coletados do leito de feridas crônicas de pacientes tratados com a terapia fotodinâmica antimicrobiana em uma Policlínica Universitária na região Centro-Sul do Paraná. Foram coletadas 19 amostras de 6 pacientes que, posteriormente foram semeadas nos meios de cultura Ágar sangue, Ágar CLED e Ágar McConkey. Após o crescimento das colônias, foi realizada a identificação dos microrganismos através da coloração de Gram e de provas fenotípicas-bioquímicas. Foram isoladas 23 cepas bacterianas, sendo 12 (52,2%) pertencentes ao grupo dos cocos gram-positivos, e 11 (47,8%) ao grupo dos bacilos gram-negativos. As espécies mais prevalentes foram *Staphylococcus aureus* (n=7) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=4). No teste de susceptibilidade aos antimicrobianos, 11 (47,8%) das 23 cepas isoladas e identificadas demonstraram resistência a pelo menos um antimicrobiano de 3 classes farmacológicas diferentes, sendo consideradas cepas multirresistentes. O conhecimento sobre o perfil epidemiológico e de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias presentes nas feridas crônicas é extremamente importante para a melhor escolha do tratamento dessas infecções, evitando o uso indiscriminado dos antimicrobianos. Além disso, os dados servem como um alerta sobre a importância da utilização de novas alternativas no tratamento de infecções, as quais podem contribuir para a redução do aparecimento de cepas multirresistentes.

PALAVRAS-CHAVE: Infecção de feridas; Cicatrização de feridas; Terapia fotodinâmica; Farmacorresistência bacteriana.

1 INTRODUÇÃO

Feridas crônicas são definidas como qualquer interrupção no tecido corporal, de grande ou pequena extensão, decorrentes de traumas e/ou doenças crônicas como diabetes, hipertensão e transtornos venosos, as quais não apresentam progresso na cicatrização durante um período superior a 3 meses ^{1, 2}. Por estarem relacionadas com tais doenças, as feridas crônicas apresentam uma alta taxa de prevalência e incidência em pessoas idosas, tornando-as um problema de saúde pública ³.

Muitas feridas crônicas apresentam-se infectadas por microrganismos, que além de tornar o processo de cicatrização mais lento, podem apresentar aumento da dor no local da

¹ Graduando em Farmácia pelo Centro Universitário UniGuairacá.

² Graduação em Farmácia e Bioquímica, Mestrado e Doutorado em Ciências - Bioquímica pela Universidade Federal do Paraná (UFPR).

lesão, aumento da área da lesão e complicações sérias, levando ao comprometimento da qualidade de vida ^{4,5}.

O método mais utilizado nos dias de hoje para o tratamento de feridas crônicas infectadas é a associação da limpeza regular da lesão com a utilização de antibióticos de uso tópico ou sistêmico. No entanto, a baixa vascularização apresentada na maioria das feridas dificulta a ação do antimicrobiano no local da infecção quando administrado sistemicamente, por isso, fármacos de administração tópica no local da lesão são mais utilizados, como neomicina e a sulfadiazina de prata ^{6,7}.

Nos últimos tempos, uma grande dificuldade no tratamento antimicrobiano das feridas crônicas é a crescente resistência dos patógenos causadores dessas infecções, o que resulta em aumento na morbidade e mortalidade de pacientes ⁸. A resistência bacteriana pode ocorrer devido a características intrínsecas de uma determinada espécie, ou então de forma adquirida. A resistência intrínseca ocorre devido a propriedades fenotípicas de uma determinada espécie, enquanto a resistência adquirida ocorre por meio da aquisição de genes de resistência através de plasmídeos e transposons, ou então pela mutação genética causada por diversos fatores, entre eles, o mau uso e/ou uso excessivo dos fármacos antimicrobianos ^{9,10,11}.

Entre as espécies bacterianas causadoras de infecções em feridas, destacam-se, na fase inicial do processo infeccioso, microrganismos gram-positivos, como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes*, e, em contrapartida, microrganismos gram-negativos, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* são detectados geralmente nos estágios finais do processo, isto é, quando a ferida crônica já está desenvolvida ¹².

Apesar da gravidade da resistência antimicrobiana, nos últimos 40 anos foram raros os novos antibióticos desenvolvidos, por isso tem se buscado novas alternativas de tratamento para feridas crônicas infectadas. Uma alternativa de tratamento possível é a terapia fotodinâmica antimicrobiana (TFDa), pois permite a inativação dos microrganismos sem induzir resistência e, além disso, permite também a redução de medicamentos antimicrobianos sistêmicos, os quais estão entre as causas responsáveis pelo aparecimento de microrganismos resistentes ^{13,14,15}. A TFDa consiste na utilização de um fotossensibilizador (FS), que corresponde a um corante não tóxico, associado a aplicação de luz visível em comprimento de onda específico, os quais produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) como, por exemplo, o oxigênio singlete, responsável por promover um efeito citotóxico aos microrganismos presentes na lesão ^{16,17}.

A presença de microrganismos multirresistentes como agentes etiológicos de infecções em feridas crônicas, torna-se, um problema para o tratamento dessas lesões. Sabendo disso, é de extrema importância a identificação e a determinação do perfil de susceptibilidade de

isolados presentes nas lesões, uma vez que os achados podem auxiliar na escolha correta do tratamento medicamentoso, e estimular o uso de novas formas de tratamento como, por exemplo, a terapia fotodinâmica, uma vez que a mesma ainda é considerada uma alternativa coadjuvante no tratamento antimicrobiano ^{18, 19, 20}.

Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo identificar e determinar o perfil de susceptibilidade de isolados bacterianos coletados do leito de feridas crônicas de pacientes tratados com a terapia fotodinâmica antimicrobiana em uma Policlínica Universitária na Região Centro-Sul do Paraná.

2 MÉTODOS

2.1 Critérios de inclusão

Pacientes com idade superior a 18 anos, portadores de feridas crônicas considerando a definição de Nunan e colaboradores (2014) ², não usuários de antibióticos por via tópica e/ou oral, submetidos ao tratamento com a TFDa e que aceitaram participar do estudo.

2.2 Coleta e transporte das amostras

Precedendo a coleta, foi realizada a limpeza nas feridas. Posteriormente, as amostras foram coletadas com swab estéril pela enfermeira responsável pelo tratamento e acompanhamento dos pacientes com feridas crônicas atendidos na Policlínica UniGuairacá. As amostras foram coletadas sempre da mesma lesão, e o intervalo entre as coletas no mesmo paciente foi após 5 aplicações da TFDa. Dessa forma, o número de coletas realizada em cada paciente teve variações. No total, foram realizadas 19 coletas, em diferentes momentos, de 6 pacientes portadores de feridas crônicas causadas por transtornos venosos e/ou diabetes, localizadas nos membros inferiores.

O material coletado foi transportado em meio Stuart até o laboratório de microbiologia do Centro Universitário UniGuairacá, onde os experimentos foram realizados.

2.3 Crescimento e identificação dos isolados

As amostras foram semeadas nos meios de cultura Ágar sangue, Ágar CLED e Ágar McConkey. Após 24h/37°C foi realizada a coloração de Gram e, posteriormente, as provas de identificação de acordo com o aspecto morfotintorial da colônia.

Nas bactérias identificadas como cocos gram-positivos (CGP) foram realizadas as seguintes provas: hemólise em ágar sangue, catalase, coagulase em tubo, manitol, crescimento em meio de tolerância ao NaCl 6,5% (MTS) e bile-esculina, de acordo com o grupo bacteriano.

Para a identificação dos bacilos gram negativos (BGN), após o crescimento em Ágar MacConkey foi realizado o teste de fermentação/oxidação de glicose e a prova da oxidase.

Quando a bactéria se mostrou fermentadora e oxidase negativa, utilizou-se o Kit de Identificação de Enterobactérias (Newprov®), contendo as provas de consumo de carboidratos e aminoácidos, produção de gás e de H₂S, motilidade e produção de indol. Bactérias não-fermentadoras foram identificadas através do Kit para BGN – não fermentadores (Newprov®), contendo os meios OF glicose, OF maltose, OF lactose, OF xilose, ágar cetrimide, gelatina nutriente e nitrato de motilidade.

2.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Após a identificação das bactérias isoladas foi realizado o teste de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizando o método de difusão em discos (KirbyBauer) preconizado pelo *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCast) ^{21,22}.

Cada cepa isolada foi inoculada em solução salina com o auxílio de uma alça bacteriológica, cuja turvação do inóculo foi comparada e ajustada ao padrão 0,5 de Mac Farland.

As placas utilizadas para a realização do experimento continham o meio de cultura ágar Müeller-Hinton e a semeadura do inóculo bacteriano foi realizada com o auxílio de um swab estéril, visando cobrir toda a superfície da placa, para a formação de um “tapete” de bactérias sob o meio. Posteriormente, foram inseridos sob o meio de cultura os discos de papel-filtro contendo os antimicrobianos sugeridos pelo BrCast. A placa foi incubada por um período de 18 - 24h em estufa a 35°C ±2 °C, e logo após foi realizada a mensuração dos halos de inibição com auxílio de uma régua. Os microrganismos foram classificados como: S (sensível), I (sensível aumentando a exposição) ou R (resistente), de acordo com o diâmetro do halo de inibição formado na placa e utilizando as tabelas de pontos de corte determinados pelo BrCast.

Para as bactérias da família Enterobacteriaceae foram testados os seguintes antimicrobianos: Ampicilina (10 µg), Amoxicilina + Clavulanato (20 mcg + 10µg), Cefalexina (30 µg), Ceftazidimí (30 µg), Ceftriaxona (30 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Aztreonam (30 µg), Ciprofloxacino (5 µg), Levofloxacino (5 µg), Sulfametoxazol + Trimetoprim (23,75µg + 1,25µg), Cefotaxima (30 µg) e Cefazolina (30 µg).

Para *Staphylococcus* spp.: Cefoxitina (30 µg), Penicilina (10 µg), Ciprofloxacino (5µg), Levofloxacino (5 µg), Amicacina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Eritromicina (15 µg), Clindamicina (2 µg) e Tetraciclina (30 µg).

Para *Pseudomonas* spp.: Cefepime (30 µg), Ceftazidimí (30 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Aztreonam (30 µg), Ciprofloxacino (5 µg), Levofloxacino (5 µg) e Amicacina (30 µg).

Para *Enterococcus* spp.: Ampicilina (10 µg), Imipenem (10 µg), Norfloxacino (10 µg), Vancomicina (30 µg), Linezolida (30 µg), Sulfametoxazol + Trimetoprim (23,75 µg + 1,25 µg).

2.5 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Unicentro e aprovado sob número de parecer 4.099.134.

3 RESULTADOS

3.1 Culturas e identificação dos isolados

Das 19 amostras coletadas, 18 (94,7 %) tiveram cultura positiva, e apenas em uma não houve crescimento de nenhuma colônia. Em 27,7% (n=5) das amostras positivas foi possível observar o crescimento polimicrobiano. Nas demais, houve o crescimento de apenas um microrganismo (Tabela 1).

TABELA 1 – Coletas realizadas e cepas identificadas.

PACIENTE	Nº COLETAS	MICROORGANISMOS ISOLADOS E IDENTIFICADOS	Nº ISOLADOS
J. V	2	1º - <i>Morganella morganii</i> e <i>S. aureus</i> (A).	3
		2º - <i>S. aureus</i> (B).	
G. M	8	1º - <i>Citrobacter freundii</i>	10
		2º - <i>E. coli</i>	
		3º - Sem crescimento microbiano	
		4º - <i>Proteus mirabilis</i>	
		5º - <i>P. aeruginosa</i> (A) e <i>S. aureus</i> (A)	
		6º - <i>P. aeruginosa</i> (B)	
		7º - <i>P. aeruginosa</i> (C) e <i>S. aureus</i> (B)	
		8º - <i>P. aeruginosa</i> (D) e <i>S. aureus</i> (C).	
E. F	2	1º - <i>Staphylococcus coagulase negativa</i> (SCN) (A)	3
		2º - SCN (B) e <i>E. coli</i>	
R. S	4	1º - <i>Proteus vulgaris</i>	4
		2º - <i>E. coli</i>	
		3º - SCN (A)	
		4º - SCN (B)	
L. S	2	1º - <i>S. aureus</i>	2
		2º - <i>Enterococcus sp.</i>	
A. D	1	1º - <i>S. aureus</i>	1
TOTAL	19		23

Fonte: os autores (2022).

Nota: espécies identificadas mais de uma vez no mesmo paciente estão diferenciadas pelas letras A, B, C e D.

Foram isoladas no total 23 cepas bacterianas, sendo 12 (52,2%) pertencentes ao grupo dos CGP, e 11 (47,8%) ao grupo dos BGN (Tabela 1).

Entre os CGP, pode-se observar prevalência do gênero *Staphylococcus* spp., sendo *S. aureus* a espécie mais vezes identificada desse gênero (n=7), seguido de SCN (n=4). Com apenas 1 cepa, o outro gênero identificado entre os CGP foi *Enterococcus* sp. (Tabela 1).

Dentre os BGN (n=11), é possível observar uma maior diversidade de espécies identificadas, apesar da prevalência de bactérias pertencentes a família Enterobacteriaceae (n=7). Entre as cepas Enterobacteriaceae, a espécie mais vezes identificada foi *E. coli* (n=3), seguido por *C. freundii*, *M. morgani*, *P. mirabilis* e *P. vulgaris*, com 1 isolado de cada espécie. Entretanto, a espécie mais prevalente entre os BGN foi *P. aeruginosa* (n=4), sendo a única espécie gram-negativa identificada não pertencente à família Enterobacteriaceae (Tabela 1).

3.2 Perfil de susceptibilidade – CGP

QUADRO 1 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados gram-positivos.

Paciente - Cepa	ANTIBIÓTICOS TESTADOS														
	CFO	PEN	CIP	LVX	AMI	GEN	ERI	CLI	TET	IPM	NOR	VAN	LNZ	SUT	AMP
JV - <i>S. aureus</i> (A)	S	R	I	I	S	S	R	S	S	*	*	*	*	*	*
JV - <i>S. aureus</i> (B)	S	R	I	I	S	S	R	S	S	*	*	*	*	*	*
GM - <i>S. aureus</i> (A)	S	S	I	I	S	S	S	S	S	*	*	*	*	*	*
GM - <i>S. aureus</i> (B)	S	S	I	I	S	S	S	S	S	*	*	*	*	*	*
GM - <i>S. aureus</i> (C)	S	R	I	I	S	R	R	R	S	*	*	*	*	*	*
AD - <i>S. aureus</i>	S	R	I	I	S	R	R	R	S	*	*	*	*	*	*
LS - <i>S. aureus</i>	S	R	I	I	S	S	R	S	S	*	*	*	*	*	*
RS - SCN (A)	R	R	I	I	S	R	R	S	S	*	*	*	*	*	*
RS - SCN (B)	R	R	I	I	S	R	R	S	S	*	*	*	*	*	*
EF - SCN (A)	R	R	I	I	S	R	I	R	R	*	*	*	*	*	*
EF - SCN (B)	R	R	I	I	S	S	I	R	R	*	*	*	*	*	*
LS - <i>Enterococcus</i> sp.	*	*	*	*	*	*	*	*	*	S	I	S	S	S	S

Fonte: os autores (2022).

Nota: S= Sensível, I= Sensível aumentando a exposição, R= Resistente.

Antibióticos: AMI (amicacina), AMP (ampicilina), CFO (cefotaxima), CIP (ciprofloxacino), CLI (clindamicina), ERI (eritromicina), GEN (gentamicina), IPM (imipenem), LVX (levofloxacino), LNZ (linezolida), NOR (norfloxacino), PEN (penicilina), SUT (sulfametoxazol + trimetoprim), TET (tetraciclina) VAN (vancomicina).

*Antibiótico não testado

Entre os isolados de *S. aureus*, 2 cepas demonstraram resistência a 4 antibióticos, 3 foram resistentes a 2 fármacos, e 2 não demonstraram resistência a nenhuma das drogas testadas. Observa-se que os fármacos mais efetivos contra os isolados de *S. aureus* foram cefoxitina, amicacina e tetraciclina, efetivos em todas as cepas dessa espécie. Em contrapartida, os antibióticos menos eficazes contra os isolados dessa espécie foram penicilina G e eritromicina, aos quais 5 (71,4%) das 7 cepas de dessa espécie demonstraram ser resistentes (Quadro 1). Além disso, nenhuma das cepas foi detectada como *Staphylococcus aureus* resistente a metilicina (MRSA).

Nos isolados identificados como SCN, é possível observar cepas resistentes a um maior número de antimicrobianos. Todas as cepas demonstraram resistência a pelo menos 1 agente, em três ou mais classes antimicrobianas diferentes. Os fármacos menos efetivos nessas cepas foram penicilina G e cefoxitina, pelos quais todos os isolados demonstraram ser resistentes. Tetraciclina e clindamicina foram fármacos eficazes em metade dos isolados (n=2). O único fármaco efetivo contra 100 % das cepas foi amicacina (Quadro 1).

Frente a classe das fluoroquinolonas (ciprofloxacino, levofloxacino, norfloxacino), todos os CGP tiveram o mesmo perfil de susceptibilidade, sensibilidade aumentando a exposição (Quadro 1).

A cepa de *Enterococcus sp.* demonstrou sensibilidade a todos os antibióticos testados, exceto ao norfloxacino (Quadro 1).

3.3 Perfil de susceptibilidade – BGN

Entre os BGN isolados, *C. freundii* foi a cepa que apresentou resistência ao maior número de antibióticos, sendo resistente a 8 fármacos, de classes 4 distintas: penicilinas (2º geração), cefalosporinas (1º e 3º geração), fluoroquinolonas, e sulfonamidas. Os fármacos que demonstraram mais efetividade contra essa cepa foram imipenem, meropenem, aztreonam e a ceftazidima. Em contrapartida, a cepa resistente ao menor número de antibióticos foi *M. morgani*, apresentando resistência a apenas um dos antibióticos testados, o aztreonam (Quadro 2).

O antibiótico mais efetivo contra os membros da família Enterobacteriaceae foi a ceftazidima, ao qual nenhuma das cepas apresentou resistência, 5 foram sensíveis e 2 sensíveis aumentando a exposição. Já o antibiótico menos efetivo foi a ampicilina, ao qual 5 cepas demonstraram ser resistentes, e 2 foram sensíveis. Além disso, 3 (42,8%) dos 7 isolados Enterobacteriaceae foram resistentes ao sulfametoxazol+trimetoprim, o único agente antimicrobiano pertencente a classe das sulfonamidas (Quadro 2).

Nos isolados do gênero *Pseudomonas* spp., observa-se sensibilidade de todos os isolados ao meropenem e a amicacina, demonstrando 100% de efetividade desses antimicrobianos. Uma das cepas (B) demonstrou resistência ao cefepime, aztreonam, ciprofloxacino e levofloxacino. Os demais isolados (A, C e D) demonstraram o mesmo perfil de susceptibilidade, não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos testados, foram sensíveis ao meropenem e amicacina, e sensíveis aumentando a exposição a ceftazidima, cefepime, imipenem, aztreonam, ciprofloxacino e levofloxacino (Quadro 2).

De um total de 23 cepas isoladas e identificadas, 11 (47,8%) demonstraram resistência há pelo menos 1 antibiótico de 3 classes farmacológicas diferentes.

QUADRO 2 – Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados gram-negativos.

Paciente - Cepa	ANTIBIÓTICOS TESTADOS														
	AMP	AMC	CFE	CFZ	CAZ	CRO	CTX	CPM	IPM	MER	ATM	CIP	LVX	SUT	AMI
JV - <i>M. morgani</i>	S	S	S	I	S	S	S	*	S	S	R	S	S	S	*
GM - <i>C. freundii</i>	R	R	R	R	S	I	R	*	S	S	S	R	R	R	*
GM - <i>E. coli</i>	R	S	S	I	S	S	S	*	S	S	S	R	S	S	*
GM - <i>P. mirabilis</i>	R	S	S	I	S	S	S	*	S	S	S	R	R	R	*
RS - <i>P. vulgaris</i>	R	S	S	I	S	S	S	*	S	R	S	S	S	R	*
RS - <i>E. coli</i>	R	R	I	S	I	S	S	*	R	R	R	S	S	S	*
EF - <i>E. coli</i>	S	S	R	I	I	R	S	*	S	S	R	S	I	S	*
GM - <i>P. aeruginosa</i> (A)	*	*	*	*	I	*	*	I	I	S	I	I	I	*	S
GM - <i>P. aeruginosa</i> (B)	*	*	*	*	I	*	*	R	I	S	R	R	R	*	S
GM - <i>P. aeruginosa</i> (C)	*	*	*	*	I	*	*	I	I	S	I	I	I	*	S
GM - <i>P. aeruginosa</i> (D)	*	*	*	*	I	*	*	I	I	S	I	I	I	*	S

Fonte: os autores (2022).

Nota: S= Sensível, I= Sensível aumentando a exposição, R= Resistente.

Antibióticos: AMI (amicacina), AMC (amoxicilina + clavulanato), AMP (ampicilina), ATM (aztreonam), CFE (cefalexina), CFZ (cefazolina), CPM (cefepime), CTX (cefotaxima), CAZ (ceftazidima), CRO (ceftriaxona), CIP (ciprofloxacino), IPM (imipenem), LVX (levofloxacino), MER (meropenem), SUT (sulfametoxazol+trimetoprim).

*Antibiótico não testado

4 DISCUSSÃO

A alta porcentagem de culturas positivas (94,7%) encontrada no presente estudo demonstra semelhança com dados obtidos no trabalho de Pieri e colaboradores (2021), onde foram coletadas 25 amostras de feridas e em apenas uma não houve crescimento bacteriano²³. A colonização de bactérias em feridas promove efeitos negativos por vários mecanismos, sendo um deles, a contribuição para um maior recrutamento de células do sistema imunológico no local da lesão, resultando em uma resposta exacerbada e, dessa forma, dificultando a cicatrização. Sendo assim, o alto número de culturas positivas indica que a colonização bacteriana em feridas pode ser um sério problema para os estabelecimentos da saúde, e requer ações para o controle^{24, 25}.

No trabalho de Bessa e colaboradores (2015), a taxa de culturas polimicrobianas em amostras de feridas foi de 27,2%, corroborando os dados do presente estudo²⁶. Uma pesquisa realizada por Yadav e colaboradores (2017) demonstra que a colonização de apenas um microrganismo e a colonização polimicrobiana induz respostas diferentes do organismo do hospedeiro²⁷. Negut e colaboradores (2018) alertam que a colonização polimicrobiana causa sinergia entre as espécies, aumentando a sobrevivência, facilitando a formação de biofilmes e favorecendo a troca genética, o que contribui significativamente para a falta de sucesso no tratamento antimicrobiano²⁸.

A identificação dos isolados demonstrou predomínio de bactérias gram-positivas (52,2%), resultado diverso com os dados encontrados na pesquisa de Pieri e colaboradores (2021), que demonstraram prevalência de microrganismos gram-negativos em feridas crônicas²³. Esse dado pode ser explicado pelo fato de que cepas gram-positivas, principalmente de *Staphylococcus* sp. que fazem parte da microbiota da pele, são transmitidas facilmente para o local da lesão, por contato direto ou indireto, causando a infecção na lesão²⁹. Além disso, em nosso estudo, foram realizadas coletas dos mesmos pacientes em diferentes momentos, trazendo dessa forma, um panorama mais real da etiologia dessas infecções.

As espécies mais prevalentes no presente estudo foram *S. aureus* (n=7) e *P. aeruginosa* (n=4), resultado que é comumente encontrado em outros estudos que identificam bactérias isoladas de feridas crônicas^{23,30}. Dados encontrados na literatura demonstram que feridas infectadas por esses microrganismos geralmente apresentam um processo de cicatrização mais lento, e alguns estudos relatam que *S. aureus* e *P. aeruginosa* evadem-se do sistema imunológico do hospedeiro, ocasionando infecções persistentes devido a formação de biofilmes, causando uma maior dificuldade no tratamento dessas infecções^{30,31}. A identificação de SCN também foi frequente, porém não foi possível a realização de identificação em nível de

espécie. Nos laboratórios com recursos limitados, os SCN geralmente não são identificados em nível de espécie devido as limitações apresentadas em testes fenotípicos clássicos³².

Embora *P. aeruginosa* seja o BGN mais isolado, cepas da família Enterobacteriaceae como, por exemplo, *E. coli*, *P. mirabilis* e *C. freundii* também foram identificadas, as quais comumente são encontradas em feridas crônicas, mesmo que em menor número³³.

A alta resistência dos isolados de *Staphylococcus* spp. á penicilina G demonstra semelhança com os dados encontrados nos trabalhos de Menezes e colaboradores (2021) e Wong e colaboradores (2015), no qual a maior parte das cepas deste gênero demonstraram alta taxa de resistência ao fármaco^{20,30}. *S. aureus* é uma importante espécie quando se fala em resistência bacteriana, pois apesar de ser susceptível à ação de várias drogas contra bactérias gram-positivas, tais como penicilinas, tetraciclina, cloranfenicóis e cefalosporinas, a espécie também ganhou reconhecimento por adquirir resistência a todas essas drogas. A espécie acabou se tornando totalmente resistente à penicilina através da produção da enzima β -lactamase e, em pouco tempo, também foi capaz de tornar-se resistente à meticilina, uma penicilina resistente a β -lactamase, dando origem às cepas multirresistentes chamadas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)^{34, 35, 36}. Embora dados encontrados na literatura demonstrem que este patógeno tem sido cada vez mais comum em feridas crônicas, no presente estudo nenhum MRSA foi detectado, uma vez que, segundo o BrCast (2022), isolados de *S. aureus* que apresentarem resistência a cefoxitina podem ser considerados MRSA^{21, 26}, fato que não foi observado em nenhuma cepa desta espécie (Quadro 1).

Todas as cepas de SCN foram resistentes a penicilina G e a cefoxitina, resultado que, de acordo com o BrCast, prevê a resistência dessas cepas a todas as penicilinas²². Por vários anos, os SCN foram subestimados como agentes causadores de infecções, no entanto, hoje em dia o potencial patogênico é bem estabelecido, e esses microrganismos tem sido associados a diversas infecções oportunistas com isolados multirresistentes.³⁷

Apesar de todos os isolados gram-positivos terem sido considerados “sensíveis aumentando a exposição” aos agentes da classe das fluoroquinolonas, esse resultado não significa que infecções tratadas com esses antimicrobianos não terão sucesso terapêutico. O BrCast (2021) alerta que, nesse caso há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico se a exposição for aumentada, ajustando-se o regime de dosagem ou aumentando a concentração no local de infecção.²²

A alta sensibilidade dos isolados Enterobacteriaceae frente a ceftazidima corrobora com os dados encontrados no trabalho de Silva e colaboradores (2018), no qual as cepas desta família também demonstraram alta sensibilidade a esse fármaco, um agente da classe das

cefalosporinas, de amplo espectro.³⁸ Por outro lado, um dado que preocupa é a alta resistência dessas cepas à ampicilina, uma vez que, segundo um levantamento realizado por McCoy e colaboradores (2017), a ampicilina é um agente de primeira escolha na lista de antimicrobianos prescritos para o tratamento de infecções de pele e tecidos moles causados por gram-negativos³⁹.

A resistência de 42,8% (n=3) das cepas da família Enterobacteriaceae ao sulfametoxazol+trimetoprim (sulfonamidas) serve como alerta, pois a maior parte dos portadores de feridas crônicas necessitam de tratamentos ofertados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e o principal antibiótico utilizado nesses casos é a sulfadiazina de prata 1%, representante desta classe antimicrobiana^{6, 40}.

C. freundii foi a cepa Enterobacteriaceae que apresentou maior resistência aos antimicrobianos testados, resultado que não é frequentemente encontrado na literatura em trabalhos com amostras de feridas crônicas, entretanto, alguns trabalhos relatam sua patogenicidade e correlacionam com a alta utilização de antimicrobianos de amplo espectro^{41, 42}.

Menezes et al. (2021) e Cantón et al. (2019) obtiveram resultados similares aos desse estudo, considerando que as cepas de *P. aeruginosa* demonstraram maior sensibilidade aos fármacos amicacina e meropenem^{20, 43}. Apesar disso, uma das cepas demonstrou ser resistente a agentes de 3 classes farmacológicas distintas, sendo considerada uma cepa multirresistente. Um dos fatores que explicam a multirresistência dessa cepa é o fato da espécie demonstrar resistência intrínseca a muitos antibióticos e, além disso, adquirir mecanismos de resistência adicionais através de mutações⁴⁴.

Uma alta porcentagem dos isolados (47,8%) demonstrou multirresistência de acordo com a classificação de Magiorakos e colaboradores (2012), a qual determina que para uma cepa ser considerada multirresistente, a mesma deve apresentar resistência a pelo menos um agente em três ou mais classes antimicrobianas⁴⁵. De acordo com Rosa e colaboradores (2017), o uso excessivo de antimicrobianos sistêmicos e locais nessas infecções é a principal causa do aparecimento de cepas multirresistentes, as quais exigem, na maioria das vezes, tratamentos com custo elevado, dificultando o tratamento e aumentando a taxa de morbidade e mortalidade dos pacientes^{46, 30}.

Diante do alto número de culturas positivas e de diversas cepas multirresistentes, o presente estudo demonstra que o tratamento de feridas crônicas infectadas é um desafio para os profissionais de saúde. A atuação de uma equipe multiprofissional é essencial para que sejam tomadas as melhores condutas, tanto no tratamento antimicrobiano, quanto em medidas não

farmacológicas, associação que quando realizada de forma correta, é essencial para a cicatrização das feridas. Conhecer o perfil dessas infecções é extremamente importante para a melhor escolha no seu tratamento, evitando o uso indiscriminado dos antimicrobianos. Além disso, esses dados alertam sobre a importância da utilização de novas alternativas no tratamento de infecções, as quais podem reduzir a pressão seletiva ocasionada pelo uso incorreto dos antibióticos, contribuindo diretamente para a redução do aparecimento de cepas multirresistentes.

5 REFERÊNCIAS

1. BRITO, K. K. G. et al. Feridas crônicas: abordagem da enfermagem na produção científica da pós-graduação. **Revista de Enfermagem da UFPE**, v. 7, n. 2, p. 414-21, 2013.
2. NUNAN, R; HARDING, K. G; MARTIN, P. Clinical challenges of chronic wounds: searching for an optimal animal model to recapitulate their complexity. **Disease models & mechanisms**, v. 7, n. 11, p. 1205-13, 2014.
3. VIEIRA, C. P. B; ARAUJO, T. M. E. Prevalence and factors associated with chronic wounds in older adults in primary care. **Rev Esc Enferm USP**, v. 52, 2018.
4. SARHEED, O.; AHMED, A.; SHOUQAIR, D. ; BOATENG, J. Antimicrobial dressings for improving wound healing, Wound Healing-New insights into Ancient Challenges, **InTech**, 2016.
5. SAHU, K; SHARMA, M; GUPTA, P. K. Modulation of inflammatory response of wounds by antimicrobial photodynamic therapy. **LaserTherapy**, v. 24, n. 3, p. 201-208, 2015.
6. NOEL, S. P. et al. Chitosan Sponges to Locally Deliver Amikacin and Vancomycin: A Pilot In Vitro Evaluation. **Clinical Orthopaedics & Related Research**, v. 468, n. 8, p. 2074–2080, ago. 2010.
7. SCALISE, A. et al. Microenvironment and microbiology of skin wounds: the role of bacterial biofilms and related factors. **Seminars in Vascular Surgery**, v. 28, n. 3-4, p. 151–159, set. 2016.
8. RAMSAY, I. D; TOROK, M. E. Skin and soft tissue infections, **Medicine**, v. 45, n.11, p. 699-706, 2017.
9. HOLMES, A. H. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 387, n. 10014, p. 176-8, 2016.
10. MOTA, F. S; OLIVEIRA, H. A; SOUTO, R. C. F. Perfil e prevalência de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas isoladas de pacientes de uma unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n.3, p. 270-277, 2018.
11. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Módulo 3 Resistência Microbiana – mecanismo e impacto clínico**. Brasília: Ministério da Saúde; 2007.

12. CARDONA, A. F; WILSON, S. E. Skin and soft-tissue infections: a critical review and the role of telavancin in their treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, p. 69–78, 2015.
13. SILVA, R. A. et al. Resistência a Antimicrobianos: a formulação da resposta no âmbito da saúde global. **Saúde em debate**, v. 44, n. 126, p. 607-623, 2020.
14. PANTÓ, F. et al. Efficacy and safety of photodynamic therapy with RLP068 for diabetic foot ulcers: a literature review and clinical experience. **Drugs in context**, p. 1-7, 2019.
15. VECCHIO, D. et al. Bacterial photodynamic inactivation mediated by methylene blue and red light is enhanced by the synergistic effect of potassium iodide. **Antimicrob Agents Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5203-5212, 2015.
16. MOURA, J. P. G; BRANDÃO, L. B; BARCESSAT, A. R. P. Estudo da Terapia Fotodinâmica (PDT) no reparo de lesões teciduais: estudo de casos clínicos. **Estação Científica**, v. 8, n. 1, p. 103-110, 2018.
17. NESI-REIS, V. et al. Contribution of photodynamic therapy in wound healing: A systematic review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, n. 3, p. 294-305, 2018.
18. SIMÕES, T. M. S. et al. Aplicabilidade da terapia fotodinâmica antimicrobiana na eliminação do *Enterococcus faecalis*. **Archives of Health Investigation**, v. 7, n.11, p. 492-496, 2018.
19. JOVILIANO, R. D; MELO, S. A; CENI, H. M. R. Alternativas terapêuticas e aplicação de bacteriófagos como estratégia no uso de antibióticos no tratamento de doenças bacterianas. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 1, p. 88-95, 2020.
20. MENEZES, L. K. et al. Incidência de microrganismos multirresistentes em lesões de pele de pacientes hospitalizados. **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.3, p. 31839-31855, 2021.
21. BRASILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). Método de Disco-difusão do EUCAST para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos - Versão em Português do the EUCAST Disk Diffusion Method (2021).
22. BRASILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (BrCAST). Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos – Versão em Português do EUCAST Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters (2022).
23. PIERI, G. P. **Isolamento, identificação e perfil de suscetibilidade à antibacterianos em feridas venosas crônicas**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2021.
24. MANGONI, M. L; MCDERMOTT, A. M; ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides and wound healing: Biological and therapeutic considerations. **Experimental Dermatology**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 167–173, 2016.

25. MAMA, M; ABDISSA, A; SEWUNET, T. Antimicrobial susceptibility pattern of bacterial isolates from wound infection and their sensitivity to alternative topical agents at Jimma University. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, [S. l.], 2014.
26. BESSA, L. J. et al. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: some remarks about wound infection. **International Wound Journal**, v. 12, n. 1, p. 47-52, 2015.
27. YADAV, M. K. In vitro Multi-Species Biofilms of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa and Their Host Interaction during in vivo Colonization of an Otitis Media Rat Model. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 7, n. 125, p. 1-21, 2017.
28. NEGUT, I; GRUMEZESCU, V; GRUMEZESCU, A. M. Treatment strategies for infected wounds. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 1– 59, 2018.
29. SANTOS, W. B. et al. Microbiota infectante de feridas cirúrgicas: análise da produção científica nacional e internacional. **Revista Sobecc**, v. 21, n. 1, p. 46-51, 2016.
30. WONG, S. Y; MANIKAM, R; MUNIANDY, S. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria from acute and chronic wounds in Malaysian subjects. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 9, p. 936–944, 2015.
31. SETH, A. K. et al. Quantitative comparison and analysis of species-specific wound biofilm virulence using an in vivo, rabbit-ear model. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 215, n. 3, p. 388-99, 2012.
32. ARGEMI, X. et al. Implementation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Routine Clinical Laboratories Improves Identification of Coagulase-Negative Staphylococci and Reveals the Pathogenic Role of Staphylococcus lugdunensis. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 7, 2030-6, 2015.
33. KRUMKAMP, R. et al. Spectrum of antibiotic resistant bacteria and fungi isolated from chronically infected wounds in a rural district hospital in Ghana. **PloS one**, v. 15, n. 8, p. 1-12, 2020.
34. THAMMAVONGSA, V.; et al. Staphylococcal manipulation of host immune responses. **Nature reviews microbiology**, v. 13, n. 9, p. 529–43, 2015.
35. ÁLOS, J. I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692-699, 2015.
36. SEIF, Y. et al. A computational knowledge-base elucidates the response of staphylococcus aureus to different media types. **PLOS Computational Biology**, Public Library of Science, v. 15, n. 1, p. 1–27, 2019.
37. MAY, L. et al. Trends in antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococcus in the United States, 1999 to 2012. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1404-1409, 2014.
38. SILVA, V. et al. Prevalence and susceptibility pattern of bacteria isolated from infected

- chronic wounds in adult patients. **Revista chilena de infectologia**, v. 35, n. 2, p. 155-162, 2018.
39. MCCOY, D; SEBTI, R; KUYUMJIAN, A. G. An evaluation of selected indications and appropriateness of ampicillin/sulbactam, an unrestricted antimicrobial, at a single center. **P and T**, v. 42, n. 3, p. 189–194, 2017.
40. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. *Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename 2020 [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2020.*
41. AKBAR, S; ROUT, S. P; HUMPHREYS, P. N. Draft Genome Sequences of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PS3 and *Citrobacter freundii* Strain SA79 Obtained from a Wound Dressing Associated Biofilm. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, 2015.
42. LIU, L. et al. *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. **Journal of microbiology, immunology, and infection**, v. 51, n. 4, p. 565-572, 2016.
43. CANTÓN, R. et al. Monitoring the antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms involved in intraabdominal and urinary tract infections recovered during the SMART study. **Rev Esp Quimioter**, v. 2, n. 32, p. 145- 155, 2019.
44. MELETIS, G. et al. Mechanisms responsible for the emergence of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Hippokratia**, v. 16, n. 4, p. 303–7, 2012.
45. MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.
46. ROSA, L. P. et al. Application of photodynamic therapy, laser therapy, and a cellulose membrane for calcaneal pressure ulcer treatment in a diabetic patient: A case report. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, p. 235–238, 2017.