



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**SILVANA DE LIMA VIEIRA DOS SANTOS**

---

---

**Análise clínica e microbiológica de úlceras venosas de  
pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde de Goiânia**

---

---

**Goiânia  
2012**

---

**SILVANA DE LIMA VIEIRA DOS SANTOS**

---

---

**Análise clínica e microbiológica de úlceras venosas de  
pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde de Goiânia**

---

---

Tese de Doutorado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
da Saúde da Universidade Federal de  
Goiás para obtenção do Título de  
Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra Maria Márcia Bachion

**Goiânia  
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**GPT/BC/UFG/mr**

S237a Santos, Silvana de Lima Vieira dos.  
Análise clínica e microbiológica de úlceras venosas de  
pacientes atendidos em Unidades Básicas de Saúde de  
Goiânia / Silvana de Lima Vieira dos Santos. - 2012.  
195 f. : figs., tabs.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Márcia Bachion.  
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Goiás,  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.  
Bibliografia.

1. Úlceras venosas – Análise – Goiânia (GO).

CDU: 616-002.44(817.3)

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO**

**Aluna: Silvana de Lima Vieira dos Santos**

---

**Orientadora: Maria Márcia Bachion**

**Membros:**

**1. Maria Márcia Bachion**

**2. Beatriz Guitton Renaud Baptista de Oliveira**

**3. Geraldo Sadoyama**

**4. Sandra Maria Brunini de Souza**

**5. Marinésia Aparecida Prado Palos**

**OU**

**4. Paula Regina de Souza**

**5. Lizandra Ferreira de Almeida Borges**

**Data:30/03/2012**

**Estudo desenvolvido pela Rede Goiana de Pesquisa em Avaliação e Tratamento de Feridas com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG).**

***Dedico este trabalho à minha família: Antônio Vieira dos Santos e Maria Maura Lima dos Santos (meus pais), Luciano de Lima Vieira e Fernando Lima Vieira (irmãos), Pierry, meu marido e ao meu filho, Emmanuel, pelo fato de existirem em minha vida.***

## AGRADECIMENTOS

---

*A Deus, por me proporcionar esta oportunidade de crescimento profissional e pessoal.*

*À Profª Drª Maria Márcia Bachion, pela confiança, amizade, paciência nos momentos mais difíceis da minha vida e orientação para o meu desenvolvimento profissional.*

*À Profª Lara Stefânia Netto de Oliveira Leão, coordenadora do Laboratório de Bacteriologia do IPTSP, pela amizade, paciência, presteza e dedicação ao me auxiliar na realização deste estudo.*

*À companheira Marlene Andrade Martins, pela sinceridade e amizade construída ao longo destes anos de estudo.*

*À Ana Betriz Mori Lima, pela amizade e dedicação em me ajudar a concretizar este trabalho.*

*Aos membros da Rede de Feridas, Suelen Gomes Malquias, Silvia Maria Soares Carvalho Sant'ana, Cynthia Assis de Barros Nunes e Queilene Rosa dos Santos, pela amizade e colaboração.*

*Aos amigos, em especial a Dálete Delalibera Corrêa de Faria Mota, que contribuiu direta e indiretamente para a realização deste trabalho.*

*Aos diretores e equipes de enfermagem das Unidades Básicas de Saúde de Goiânia e, em especial, aos participantes do estudo.*

*À diretoria e coordenação da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás, em nome de Ana Elisa Bauer.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.*

# SUMÁRIO

---

|                                                                                                                          |              |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>TABELAS, FIGURAS E ANEXOS.....</b>                                                                                    | <b>x</b>     |
| <b>SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>                                                                              | <b>xii</b>   |
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                       | <b>xvi</b>   |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                     | <b>xvii</b>  |
| <b>APRESENTAÇÃO.....</b>                                                                                                 | <b>xviii</b> |
| <b>1. INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                | <b>1</b>     |
| Revisão da literatura.....                                                                                               | 8            |
| Etiologia e classificação das úlceras venosas.....                                                                       | 8            |
| Processo de cicatrização de úlceras de perna e infecção.....                                                             | 12           |
| Identificação de infecção em feridas crônicas de perna.....                                                              | 14           |
| Agentes de infecção em feridas crônicas.....                                                                             | 18           |
| Desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos.....                                                                  | 27           |
| Mecanismo de resistência dos bastonetes Gram-negativos e o impacto clínico.....                                          | 32           |
| <b>2. OBJETIVOS.....</b>                                                                                                 | <b>36</b>    |
| <b>3. MÉTODOS.....</b>                                                                                                   | <b>37</b>    |
| 3.1- População e amostra.....                                                                                            | 37           |
| 3.2- Local do estudo.....                                                                                                | 38           |
| 3.3- Identificação dos possíveis participantes, seleção dos sujeitos e recrutamento.....                                 | 39           |
| 3.4- Procedimentos para a coleta dos dados.....                                                                          | 41           |
| 3.5- Identificação de sinais clínicos de infecção local na lesão e obtenção de espécime para análise microbiológica..... | 47           |
| 3.6- Equipamentos utilizados para avaliação clínica.....                                                                 | 52           |



|                                                                                                                                                                                               |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 3.7- Isolamento e identificação dos bastonetes Gram-negativos, realização dos testes de suscetibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos e detecção dos fenótipos de resistência..... | 53         |
| 3.8- Variáveis do estudo.....                                                                                                                                                                 | 65         |
| 3.9- Análise estatística.....                                                                                                                                                                 | 67         |
| 3.10- Aspectos ético-legais.....                                                                                                                                                              | 68         |
| <b>4. PUBLICAÇÕES.....</b>                                                                                                                                                                    | <b>69</b>  |
| <b>Artigo 1-</b> Suscetibilidade antimicrobiana e produção de $\beta$ -lactamase AmpC em bastonetes Gram-negativos isolados de úlceras venosas de pacientes em atendimento ambulatorial.....  | 70         |
| <b>Artigo 2-</b> Avaliação clínica de úlceras venosas: presença de sinais e sintomas de infecção e resultado de cultura para bastonetes Gram-negativos.....                                   | 95         |
| <b>5. CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                                                                      | <b>110</b> |
| <b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                                                                                           | <b>113</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                                                                                                      | <b>115</b> |
| <b>ANEXOS, APÊNDICES.....</b>                                                                                                                                                                 | <b>130</b> |

## TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

---

- Tabela 1 - Artigo 1** - Distribution of the gram-negative bacteria (n=91) identified in venous ulcers of patients treated in dressing rooms of Primary Health Centers in Goiânia, Goiás, Brazil
- Tabela 2 - Artigo 1** - Susceptibility profile of Enterobacteria (n=49) isolated from the venous ulcers of patients treated in dressing rooms of the Primary Health Centers in Goiânia, Goiás, Brazil
- Tabela 3 - Artigo 1** - Distribution of the susceptibility profile of the non-fermenting gram-negative bacteria (n=42) isolated from the venous ulcers of patients treated in the dressing rooms of Primary Health Centers in Goiânia, Goiás, Brazil
- Tabela 1 - Artigo 2** - Distribuição dos sinais e sintomas clássicos de infecção em úlceras venosas de pacientes atendidos na rede básica de saúde e suas proporções segundo o resultado da cultura
- Tabela 2 - Artigo 2** - Distribuição dos sinais adicionais de infecção em úlceras venosas de pacientes atendidos na rede básica de saúde e das proporções segundo o resultado da cultura
- Figura 1- Artigo 1** - Confirmation test for phenotype resistance to AmpC beta-lactamase. Positive result – flattened halos surrounding ceftriaxone and ceftazidime
- Figura 1 -** Condutas para a abordagem dos usuários das salas de curativos para determinação de inclusão destes no estudo. Fonte: (Sant’ana 2011)
- Figura 2 - Artigo 1** - Phenotypic test to detect metallo-beta-lactamase. **Positive result:** an expansion or distortion zone in the halo of

growth inhibition between the disks containing 2MPA or EDTA

- Figura 2 -** Tubo contendo meio de transporte *Stuart* com haste para coleta de espécime
- Figura 3 -** Teste confirmatório do fenótipo de resistência beta-lactamase tipo AmpC. Resultado positivo – achatamento dos halos dos antimicrobianos ceftriaxona e ceftazidima
- Figura 4 -** Disposição dos discos de ceftazidima (CAZ); amoxicilina+ácido clavulânico (AMC) e Aztreonam (AZT) para a realização do teste confirmatório da produção de ESBL
- Figura 5 -** Distribuição dos discos para a realização do teste fenotípico para a detecção de metalo-beta-lactamase
- Figura 6 -** Zona de expansão ou distorção no halo de inibição do crescimento entre os discos contendo o 2MPA ou EDTA
- Anexo A -** Roteiro para coleta de dados sócio demográficos e características clínicas
- Anexo B -** Roteiro para avaliação dos sinais clínicos adicionais de acordo com a EWMA
- Anexo C -** Isolamento primário e identificação presuntiva de bastonetes Gram-negativos fermentadores (enterobactérias) e não fermentadores (BGNNF)
- Anexo D -** Tabela CLSI 2009 para interpretação dos halos de inibição dos antimicrobianos
- Anexo E -** Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa
- Anexo F -** Normas de publicação dos respectivos periódicos
- Apêndice A -** TCLE
- Apêndice B -** Mapas para realização do antibiograma

## SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

---

|                           |                                                                                                          |
|---------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>A</b>                  | Ambulatórios                                                                                             |
| <b>AmpC</b>               | Beta-lactamase tipo AmpC                                                                                 |
| <b>A/A</b>                | Ápice ácido e base ácida                                                                                 |
| <b>A/A/H<sub>2</sub>S</b> | Ápice ácido e base ácida preta                                                                           |
| <b>AGE</b>                | Ácidos Graxos Essenciais                                                                                 |
| <b>AMC</b>                | Amoxicilina/ácido clavulânico                                                                            |
| <b>AMI</b>                | Amicacina                                                                                                |
| <b>ANVISA</b>             | Agência Nacional de Vigilância Sanitária                                                                 |
| <b>ATCC</b>               | <i>American Type Culture Collection</i>                                                                  |
| <b>AZT</b>                | Aztreonam                                                                                                |
| <b>BGN</b>                | Bastonetes Gram-negativos                                                                                |
| <b>BGNF</b>               | Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores                                                              |
| <b>CAIS</b>               | Centro de atenção integral à saúde                                                                       |
| <b>CAPS</b>               | Centro de atenção psicossocial                                                                           |
| <b>CAZ</b>                | Ceftazidima                                                                                              |
| <b>CESP</b>               | <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp.,<br><i>Providencia</i> spp. |
| <b>CFO</b>                | Cefoxitina                                                                                               |
| <b>CIAMS</b>              | Centros integrals de assistência médico-sanitária                                                        |
| <b>CIP</b>                | Ciprofloxacina                                                                                           |
| <b>CLSI</b>               | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>                                                       |
| <b>CNPq</b>               | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico                                            |
| <b>CONUEI</b>             | <i>Conferencia Nacional de Consenso sobre las úlceras de la</i>                                          |

*extremidad inferior*

|                           |                                                 |
|---------------------------|-------------------------------------------------|
| <b>C-N</b>                | Ligação carbono nitrogênio                      |
| <b>CPM</b>                | Cefepima                                        |
| <b>CPX</b>                | Cefpodoxima                                     |
| <b>CR</b>                 | Centros de referência                           |
| <b>CRO</b>                | ceftriaxona                                     |
| <b>CS</b>                 | Centro de saúde                                 |
| <b>CSSC</b>               | <i>Clinical Signs and Symptoms Checklist</i>    |
| <b>CTX</b>                | Cefotaxima                                      |
| <b>EDTA</b>               | Etilenodiaminotetracético                       |
| <b>EMC</b>                | Expressão da matriz extracelular                |
| <b>ESBL</b>               | Beta-lactamases de espectro ampliado            |
| <b>ESF</b>                | Estratégia Saúde da Família                     |
| <b>EWMA</b>               | <i>European Wound Management Association</i>    |
| <b>GEN</b>                | Gentamicina                                     |
| <b>GO</b>                 | Goiás                                           |
| <b>H<sub>2</sub>S</b>     | Sulfeto de hidrogênio                           |
| <b>IACS</b>               | Infecção associada aos cuidados em saúde        |
| <b>IL-10</b>              | Interleucina 10                                 |
| <b>IL-6</b>               | Interleucina 6                                  |
| <b>IMP</b>                | Imipenem                                        |
| <b>IPTSP</b>              | Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública |
| <b>ITB</b>                | Índice tornozelo braço                          |
| <b>IVC</b>                | Insuficiência venosa crônica                    |
| <b>K/A</b>                | Ápice alcalino e base ácida                     |
| <b>K/A/H<sub>2</sub>S</b> | Ápice alcalino e base ácido preto               |

|                                |                                                                                                 |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>K/K</b>                     | Ápice alcalino e base alcalino                                                                  |
| <b>KIA</b>                     | Ágar ferro de Klinger                                                                           |
| <b>LPS</b>                     | Lipopolissacarídeos                                                                             |
| <b>LVX</b>                     | Levofloxacina                                                                                   |
| <b>M</b>                       | Maternidade                                                                                     |
| <b>MBLs</b>                    | Metalo- $\beta$ -lactamases                                                                     |
| <b>MER</b>                     | Meropenem                                                                                       |
| <b>MIO</b>                     | Motilidade-indol-ornitina                                                                       |
| <b>MMII</b>                    | Membros inferiores                                                                              |
| <b>NCCLS</b>                   | <i>National Commitee for Clinical Laboratory Standards</i>                                      |
| <b>NEPIH</b>                   | Núcleo Estudos e Pesquisa em Prevenção e Controle de Infecção Relacionado aos cuidados em Saúde |
| <b>NNISS</b>                   | <i>National Nosocomial Infection Surveillance Study</i>                                         |
| <b>NR-32</b>                   | Norma regulamentadora 32                                                                        |
| <b>PDEGF</b>                   | Fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaqueta                                |
| <b>PEC</b>                     | Polímeros extracelulares                                                                        |
| <b>PIBIC</b>                   | Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica                                        |
| <b>POL</b>                     | Polimixina B                                                                                    |
| <b>PPT</b>                     | Piperacilina/tazobactam                                                                         |
| <b>PS</b>                      | Pronto socorro                                                                                  |
| <b>TCLE</b>                    | Termo de consentimento livre e esclarecido                                                      |
| <b>TET</b>                     | Tetraciclina                                                                                    |
| <b>TGF-<math>\beta</math></b>  | Fator transformador de crescimento beta                                                         |
| <b>TNF-<math>\alpha</math></b> | Fator transformador de necrose tumoral alfa                                                     |
| <b>TRI/S</b>                   | Sulfametoxazol/trimetoprim                                                                      |

|               |                                                   |
|---------------|---------------------------------------------------|
| <b>TSB</b>    | <i>Tryptic Soy Broth</i>                          |
| <b>UABSF</b>  | Unidade de atenção básica à saúde da família      |
| <b>UBS</b>    | Unidade Básica de Saúde                           |
| <b>UFG</b>    | Universidade Federal de Goiás                     |
| <b>US-FDA</b> | <i>United States Food and Drug Administration</i> |
| <b>UTI</b>    | Unidade de terapia intensiva                      |
| <b>2- MPA</b> | Ácido 2-mercaptopropiônico                        |

## RESUMO

---

Estudo transversal realizado nas salas de curativos da atenção primária a saúde em Goiânia, Goiás, Brasil, cujos objetivos foram identificar a prevalência de bastonetes Gram-negativos (BGN) em úlceras venosas (UV) com sinais clínicos de infecção; analisar o perfil de suscetibilidade dos isolados; detectar a produção de  $\beta$ -lactamases tipo AmpC, metalo-beta-lactamase e ESBL; descrever os sinais e sintomas clínicos de infecção em UV; avaliar o estágio clínico de infecção das lesões e a relação destes com a presença de BGN. Utilizou-se de análise descritiva, teste de proporções e Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). Os aspectos éticos foram observados. Participaram 69 pacientes com úlceras venosas com ou sem complicações arteriais, totalizando 98 lesões. Verificou-se que em 74,5% das lesões houve crescimento de BGN. Foram identificadas Enterobactérias (53,8%) e bastonetes Gram-negativos não fermentadores (46,2%). Dentre as enterobactérias prevaleceu a espécie *Escherichia coli* (24,5%), seguida de *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans* e *Proteus mirabilis* com 12,2% cada um. Em relação aos bastonetes Gram-negativos não fermentadores, destacou-se a prevalência do gênero *Pseudomonas* com 66,6% e em especial a espécie *P. aeruginosa* com 59,5%, presente em 25,5% das feridas analisadas. Quanto ao perfil de suscetibilidade das enterobactérias, destacaram-se a resistência à tetraciclina (38,8%), à amoxicilina-ácido clavulânico (26,5%). Entre as *P. aeruginosa*, a maior resistência foi observada para cefoxitina (100%). Quanto à produção de enzima AmpC, 30% dos micro-organismos do grupo CESP e 100% das *P. aeruginosa* foram resistentes a cefoxitina. Os demais micro-organismos do grupo CESP (70%) sensíveis à cefoxitina foram submetidos ao teste confirmatório e 37,5% apresentaram-se positivos a produção de enzima AmpC. Em relação a metalo-beta-lactamase, 23,8% dos bastonetes Gram-negativos não fermentadores apresentaram sensibilidade reduzida ao imipenem, meropenem ou ceftazidima. Ao serem submetidos ao teste confirmatório, observou-se que 8% das *P. aeruginosa* foram positivas para a enzima MBL. Não foi identificada ESBL. Quanto aos sinais e sintomas clínicos de infecção na lesão, destacaram-se, com frequência >70%: descoloração do tipo opaca e/ou tijolo vermelho escuro; aumento do volume do exsudato e dor. O estágio três de infecção foi o mais prevalente (71,4%). Houve relação entre celulite e tecido de granulação friável que sangra facilmente e o resultado de cultura para BGN. Conclui-se que a presença de patógenos Gram-negativos resistentes em pacientes na atenção primária a saúde sugere a necessidade de instituir-se vigilância microbiológica para os pacientes com UV com processo cicatricial de difícil evolução e que a identificação de infecção nas UV deve ser norteadada pelo conhecimento acerca da etiologia, características clássicas e estágios clínicos de infecção.

**Descritores:** úlcera venosa, infecção, bactéria Gram-negativa, enfermagem



## ABSTRACT

---

This cross-sectional study was performed in the dressing rooms of the primary healthcare network of Goiânia, Goiás, Brasil, with the following objectives: to identify the prevalence of Gram-negative bacteria (GNB) in venous ulcers (VU) with clinical signs of infection; analyze the susceptibility profile of the isolates; detect the production of AmpC  $\beta$ -lactamases and metallo-beta-lactamases, and extended spectrum beta-lactamase (ESBL); describe the clinical signs and symptoms of infection in VU; evaluate the wounds clinical stage of infection and its relationship with the presence of GNB. The data were analyzed by means of descriptive statistics procedures, proportion and Chi-square tests ( $p < 0.05$ ). All ethical aspects were followed. The participants were 69 patients with venous ulcers, with or without arterial complication, totaling 98 wounds. It was verified that 74.5% of the wounds showed GNB growth, particularly enterobacteria (53.8%) and non-fermenting gram-negative bacteria (46.2%). The prevalent species among the enterobacteria was *Escherichia coli* (24.5%), followed by *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans* and *Proteus mirabilis* (12.2% each). Regarding the non-fermenting gram-negative bacteria, the prevalent genre was *Pseudomonas* (66.6%), particularly the species *P. aeruginosa* (59.5%), present in 25.5% of the analyzed wounds. Regarding the susceptibility profile of the enterobacteria, the highest resistance rates were to tetracycline (38.8%) and amoxicillin-clavulanic acid (26.5%). Among *P. aeruginosa*, the highest resistance was observed for ceftazidime (100%). Regarding the production of the AmpC enzyme, 30% of the microorganisms in the CESP (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. and *Providencia* spp.) group, and 100% of the *P. aeruginosa* were resistant to ceftazidime. The remaining microorganisms of the CESP group (70%) that were sensitive to ceftazidime were subjected to a confirmatory test, and 37.5% were found to be positive for the production of the AmpC enzyme. Regarding metallo-beta-lactamase, 23.8% of the non-fermenting gram-negative bacteria showed reduced sensitivity to imipenem, meropenem or ceftazidime. When subjected to the confirmatory test, 8% of the *P. aeruginosa* were positive for the MBL enzyme. Regarding the clinical signs and symptoms of infection, the highlighted results with >70% frequency are: opaque and/or reddish brown discoloration; increase in exudate volume and pain. Stage-three infection was the most prevalent (71.4%). An association was found between cellulitis and friable granulation tissue that bleeds easily and the culture for GNB. In conclusion, the presence of gram-negative pathogens with resistance profiles in primary healthcare patients suggests the need to implement microbiological surveillance for patients with VU experiencing a prolonged or difficult healing process, and that the identification VU infection should be guided by knowledge regarding the etiology, classic characteristic and clinical stages of infection.

**Key words:** venous ulcer, infection, gram-negative bacteria, nursing

## APRESENTAÇÃO

O aprimoramento intelectual, na área de pesquisa científica, tem sido a minha meta desde a graduação, quando tive a oportunidade de desenvolver pesquisas como voluntária de iniciação científica e, logo depois, como bolsista no Núcleo de Estudos e Pesquisas em Controle de Infecção Hospitalar (NEPIH) da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás, participando de projetos de pesquisa e grupos de estudo.

Após a conclusão do curso de enfermagem, iniciei minhas atividades profissionais em um Centro de Atenção Integral à Saúde (CAIS) e, em seguida, passei a atuar na Estratégia Saúde da Família (ESF). Durante atuação nos dois cenários, tive contato com pacientes que apresentavam úlceras crônicas e observei que estes estavam sempre à procura dos serviços da sala de curativos, mas não tinham resolutividade do problema. A partir de então essa situação passou a me intrigar, mas ficou adormecida.

Com o intuito de melhorar o conhecimento sobre o desenvolvimento de pesquisas e colocar em prática o que até então havia apreendido, retornei à Faculdade de Enfermagem, após ter realizado Especialização de Enfermagem em Infectologia na Universidade de São Paulo, onde tive incentivo para permanecer nessa trajetória, e ingressei no programa de pós-graduação da Faculdade de Enfermagem da Universidade Federal de Goiás, no curso de mestrado. Concomitantemente, vinculei-me novamente ao NEPIH. Ao findar o período destinado ao desenvolvimento das atividades do mestrado, mesmo não estando ligada ao quadro de trabalhadores da Faculdade de Enfermagem, permaneci no núcleo e tive a oportunidade de orientar e desenvolver diversas pesquisas, na área de

controle de infecção relacionada ao cuidado em saúde. Em 2008, fui aprovada no concurso para professor assistente e, atualmente, sou pesquisadora do NEPIH.

Ao iniciar as atividades docentes me deparei novamente com a problemática das úlceras crônicas sem resolutividade. Na busca de ampliar meus conhecimentos sobre pesquisa, expus à Profa Dra Maria Márcia Bachion o desejo de ingressar no doutorado. Após várias conversas, ela me apresentou o projeto: “Avaliação de úlceras venosas de estase no contexto do atendimento ambulatorial na Rede Municipal de Saúde de Goiânia: ampliando as perspectivas”, e me vi novamente diante de uma temática que sempre me intrigou.

Fui convidada a participar da Rede Goiana de Pesquisa em Avaliação e Tratamento de Feridas e pude contribuir no treinamento para a coleta de dados do subprojeto de pesquisa de mestrado intitulado: “Integridade da pele de área perilesional prejudicada e integridade tissular prejudicada relacionada à circulação alterada em pessoas com úlceras vasculogênicas”. Assim, deparei-me com um contexto em que as pessoas com úlceras venosas apresentavam lesões de longa duração, com uma evolução de cicatrização desfavorável e com uma sintomatologia rica em indicadores de infecção. Emergiram questões que nortearam a elaboração da presente pesquisa: Quais micro-organismos estão presentes nas úlceras venosas crônicas que impedem o processo de cicatrização? Qual o perfil de suscetibilidade desses micro-organismos frente aos antimicrobianos frequentemente recomendados e utilizados na prática clínica? Quais sinais e sintomas clínicos indicam que essas lesões estão infectadas?

Em resposta a essas indagações, esperamos que este estudo subsidie os profissionais da área da saúde e que estimule reflexões acerca desta temática, com o propósito de que ocorram mudanças na práxis.

# 1 INTRODUÇÃO

---

As úlceras venosas têm desafiado equipes médicas e de enfermagem, por serem de difícil resolução com o uso da terapêutica convencional (FERREIRA et al., 2006; BARBOSA & CAMPOS, 2010). Com o intuito de contribuir com a cicatrização dessas lesões, outros profissionais como fisioterapeutas (SANTOS; NASCIMENTO; ANDRADE, 2009; AZOUBEL et al. 2010) e nutricionistas (PINTO et al., 2005) têm se dedicado à essa temática.

Estudos mostram que as úlceras venosas têm duração média de 5 anos, podendo ultrapassar 10 anos (FRADE et al., 2005; MARTINS & SOUZA, 2007; MARTINS, 2008). São fatores envolvidos no prolongamento do tempo de cicatrização: as alterações sistêmicas como a insuficiência venosa crônica (IVC) (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; FERREIRA et al., 2006) e o processo infeccioso, o qual compromete a viabilidade dos tecidos superficiais (FERREIRA et al., 2006).

Indivíduos que apresentem desequilíbrio imunológico, aliado a outros fatores como extremo de idade, etilismo, tabagismo, o uso de drogas, sedentarismo e privação de sono geralmente têm risco aumentado de desenvolver infecções nas úlceras (EWMA, 2005).

A carga infectante e a espécie do agente patogênico são importantes no desenvolvimento do processo infeccioso (KINGSLEY, 2003). A literatura caracteriza o *bioburden* (carga microbiana) de uma lesão em quatro categorias: contaminação, colonização, colonização crítica e infecção

(BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; KINGSLEY, 2001; BOWLER, 2003; OVINGTON, 2003; EDWARDS & HARDING, 2004).

A contaminação é a presença de bactérias na superfície da ferida, sem dependência metabólica com o hospedeiro, não provoca uma resposta imune e nem impede o desenvolvimento do processo cicatricial (EDWARDS & HARDING, 2004). Na colonização, há a dependência metabólica sem expressão clínica ou reação imunológica, não havendo alterações no processo de cicatrização (KINGSLEY, 2001; OVINGTON, 2003; EDWARDS & HARDING, 2004).

A colonização refere-se à proliferação de micro-organismos no tecido sem causar lesão ao hospedeiro ou provocar infecção. Para que estes saiam de colonizadores para agentes infecciosos, é necessário que ocorram alterações na carga microbiana, virulência do micro-organismo e na higidez imunológica do hospedeiro (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; OVINGTON, 2003; BOWLER, 2003).

Com a proliferação exacerbada de micro-organismos durante a colonização, ocorre a colonização crítica, ou seja, uma relação limítrofe entre a colonização e a infecção. A colonização crítica refere-se à presença de bactérias na superfície da ferida, com invasão dos tecidos superficiais, com liberação de toxinas e enzimas que impedem o progresso da cicatrização, e a lesão não apresenta sinais clássicos de infecção (WHITE & CUTTING, 2006).

Na colonização crítica, apesar de não ocorrer invasão de tecidos mais profundos, a granulação modifica-se em relação à cor, tornando-se vermelho

brilhante e sangrando facilmente. Tem-se rompimento da ferida, odor súbito e aumento da quantidade de exsudato (OVINGTON, 2003).

Em consequência à colonização crítica, ocorre a invasão de tecidos viáveis, com estímulo da resposta imune. Observa-se ainda um aumento da produção de exsudato e diminuição do processo cicatricial, caracterizando o quadro infeccioso (OVINGTON, 2003).

A ocorrência de infecção resulta de uma relação de parasitismo caracterizada por um desequilíbrio entre o agente infeccioso e os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro. A infecção implica em multiplicação microbiana com invasão de tecidos. Nesse caso, as bactérias passam a interferir no processo de cicatrização em decorrência da liberação de substâncias nocivas aos tecidos (BOWLER, 2003; KINSLEY, 2003; JONES, EDWARDS, THOMAS, 2004; EWMA, 2005; WHITE & CUTTING, 2006; COOPER et al., 2009).

Na abordagem terapêutica das úlceras, é importante a utilização de múltiplos métodos de avaliação, com o propósito de assegurar a detecção precoce de colonização crítica ou infecção na vigência de retardo no processo cicatricial das lesões. São necessárias avaliações clínicas que identifiquem os sinais clássicos de infecção, bem como os sinais adicionais sinalizando para o início da colonização crítica e/ou o processo infeccioso. Somada à avaliação clínica, para que a terapêutica seja assertiva, é imprescindível a realização da análise microbiológica (GARDNER; FRANTZ; DOEBBELING, 2001; EWMA, 2005; WHITE & CUTTING, 2006; COOPER et al., 2009). A avaliação clínica deve ser baseada nos estágios clínicos de

infecção, pois dará ao profissional de saúde maior subsídio para a assistência (EWMA, 2006).

Na avaliação clínica das úlceras venosas, é necessária a busca por sinais e sintomas como: dor, eritema, calor, edema, exsudato purulento, celulite, cicatrização sem evolução, aumento de temperatura da pele, aumento de dor na úlcera ou mudança na natureza da dor, formação de novas úlceras nas margens inflamadas da úlcera pré-existente, ampliação da ferida nas margens inflamadas, descoloração do leito da ferida tipo opaca ou coloração tijolo vermelho escuro, tecido de granulação friável, túnel para os tecidos moles, rompimento da ferida, exsudato sanguinolento e seroso elevado e aumento da viscosidade do exsudato (GARDNER; FRANTZ; DOEBBELING, 2001; EWMA, 2005; GARDNER et al., 2007).

A avaliação clínica requer experiência do profissional de saúde. Pode ser feita durante a observação da lesão, na realização do curativo, o qual é realizado, em geral em pelos profissionais da enfermagem (SANTOS et al., 2010).

Quanto à instituição da análise microbiológica, não há consenso, pois tem sido indicada após instituição de terapêutica antimicrobiana para tratamento de infecção de pele e partes moles, quando o tratamento não apresenta o efeito desejado, como nos casos de infecções graves causadas por micro-organismos multiresistentes (LOPES, 2005). Por outro lado, tem sido reportada como sendo de grande relevância para os pacientes acometidos por úlceras venosas (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; COOPER et al., 2009).



Em unidades de saúde de serviços ambulatoriais do município de Goiânia (GO), no contexto do tratamento de feridas crônicas, prescrevem-se vários antimicrobianos e, na maioria das vezes, sem a realização de exames microbiológicos que avaliem o perfil de suscetibilidade do micro-organismo. A magnitude do processo infeccioso torna-se, dessa maneira, um problema de difícil controle (MARTINS, 2008).

As úlceras crônicas são comumente contaminadas por bactérias provenientes da microbiota residente da pele (GARDNER et al., 2004, EWMA, 2005) e do meio ambiente (KONEMAN et al., 2008; TRABULSI, 2008).

Quanto aos micro-organismos transitórios presentes na pele, estudos têm reportado, com maior frequência, bactérias transitórias como a Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e, dentre as bactérias Gram-negativas, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Proteus* sp. (GOMES, CARVALHO, LIMA, 2009; COOPER et al., 2009). Esses são micro-organismos que causam graves alterações sistêmicas podendo levar a óbito (SEGHE TO & ARAÚJO, 2011).

Quanto ao tratamento das infecções provocadas por bactérias, sabe-se que os antimicrobianos, nos primórdios de sua utilização, traziam muitos benefícios. Já nas últimas décadas, o uso indiscriminado dessas substâncias, tanto pela terapêutica empírica (sem critério microbiológico) (ROSSI & ANDREAZZI, 2005), quanto pela automedicação, resultou em uma pressão seletiva sobre os micro-organismos e, conseqüentemente, na disseminação de resistência entre as bactérias (FONSECA et al., 2010).

Em um estudo de revisão da literatura sobre o uso de antibiótico e sua ação em feridas crônicas, foi elucidado o importante papel desses fármacos no tratamento das feridas infectadas (HOWELL-JONES, 2005). Entretanto, não há estudos que estabeleçam um protocolo para escolha terapêutica (HOWELL- JONES, 2005; O´MEARA; KURDI; OVINGTON, 2008).

Neste estudo, deu-se ênfase aos micro-organismos Gram-negativos em decorrência de sua importância clínica no processo de cicatrização das úlceras venosas (KONEMAN et al., 2008, TRABULSI, 2008) e destaque na literatura em relação ao perfil de resistência (SALGADO et al., 2011; MELO; BARBARESCO; GONTIJO FILHO, 2011; FERREIRA et al., 2011; MOREIRA et al., 2011; LEÃO et al., 2011) .

O fenômeno de resistência antimicrobiana tem gerado preocupação mundial, principalmente no que se refere à existência de opções terapêuticas adequadas. Infecções por bactérias multirresistentes e, atualmente, panresistentes têm se tornado um problema de relevante importância para os serviços de saúde, representando um desafio para a assistência à saúde (ROSSI, 2011).

Os bastonetes Gram-negativos (enterobactérias e BGNNF) têm apresentado ampla resistência aos vários antimicrobianos tradicionalmente empregados na prática. O padrão de resistência desses agentes é muito variável entre país, cidade e instituição, o que exige um monitoramento frequente do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos (TAVARES, 2002; ROSSI, 2011).

Esse tipo de investigação se torna, portanto, fundamental para que o tratamento de úlceras crônicas seja mais seguro, evitando assim complicações para o paciente e a disseminação de micro-organismos resistentes.

A avaliação clínica de sinais e sintomas de infecção, aliada ao conhecimento sobre o tipo de micro-organismo envolvido no retardo do processo de cicatrização das úlceras venosas, pode subsidiar as ações da equipe de enfermagem. No que se refere aos cuidados locais com a lesão o uso de produtos à base de iodo e prata para tratamento de feridas infectadas, dependerá do conhecimento acerca do fator de virulência do agente patogênico, ou seja, se este produz biofilme ou não (BOOTHMAN, 2009).

Quanto à organização e gerenciamento do serviço da enfermagem, esse dado pode ainda contribuir para o planejamento de medidas de reorganização do ambiente e do processo de trabalho, com o intuito de controlar e reduzir a disseminação de bactérias multirresistentes e contaminação cruzada.

A caracterização do quadro infeccioso é de suma importância, e a análise microbiológica é substancialmente necessária, pois identifica o perfil e direciona o tratamento, evitando que a terapêutica seja instituída de maneira indiscriminada. Portanto, é necessária a realização de exames microbiológicos, para se obter dados que auxiliem no processo de vigilância epidemiológica e de prevenção e controle das infecções em feridas (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; MARTINS, 2008).

A vigilância epidemiológica da microbiologia das infecções em úlceras venosas de difícil evolução cicatricial é uma prática que deve ser preocupação dos serviços de saúde, pois possibilita identificar a ocorrência de infecções por bactérias multirresistentes, além de direcionar a escolha dos antimicrobianos mais adequados ao tratamento (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001).

Acredita-se que este estudo poderá fornecer, aos serviços de saúde e gestores, subsídios para mudanças nas políticas públicas de saúde na atenção primária, levando a um redirecionamento da abordagem terapêutica das úlceras venosas de difícil cicatrização.

## **REVISÃO DA LITERATURA**

### ***Etiologia e classificação das úlceras venosas***

O sistema venoso dos membros inferiores é composto por três sistemas: veias superficiais, comunicantes e profundas. A comunicação entre os dois sistemas ocorre por meio do sistema comunicante ou perforante. Esses vasos contêm válvulas bicúspides as quais fazem com que o sangue tenha um fluxo ascendente e impedem o refluxo em condições de relaxamento da musculatura das pernas. Quando esse sistema passa a funcionar de forma inadequada, instala-se a insuficiência venosa crônica (IVC) (NUNES, 2006; ETUFUGH & PHILLIPS, 2007).

As úlceras venosas decorrem do inadequado funcionamento do sistema venoso causado por incompetência valvular, hipertensão venosa

prolongada, trombose venosa profunda ou disfunção da bomba muscular da panturrilha da perna (MAFFEI, 2002; BRIGGS & CLOSS, 2003; FRANÇA & TAVARES, 2003; NUNES, 2006; HERBER; SCHNEPP; RIEGER, 2007). Pode afetar o sistema venoso superficial, o profundo ou ambos (NUNES, 2006; ETUFUGH & PHILLIPS, 2007).

Em decorrência do fluxo sanguíneo retrógrado, instala-se a hipertensão venosa (CARMO et al., 2007). A pressão venosa nas pernas pode variar de 95 a 100 mmHg nos pacientes com comprometimento do sistema venoso superficial ou profundo, quando em repouso. Durante a deambulação, essa pressão cai para 36 mmHg no indivíduo sem alterações; naqueles com insuficiência venosa, chega a 66 mmHg. Em virtude da alteração da pressão venosa, as válvulas permitem o retorno do sangue fazendo com que ocorra um estado de hipertensão, sendo esta responsável por impedir o fechamento efetivo das válvulas (BONFIM et al., 2002).

Em relação à etiologia da hipertensão venosa dos membros inferiores, existem quatro teorias bastante discutidas e aceitas (FURTADO, 2003): a Teoria da bainha de fibrina ou Teoria de *cuff* de fibrina, a Teoria da retenção dos glóbulos brancos (Teoria dos leucócitos), a Teoria mecânica ou clássica e a Teoria da migração de fatores de crescimento (Hipótese bloqueio). A falência do músculo da panturrilha também é uma hipótese discutida e está relacionada ao envelhecimento, ao sedentarismo, às doenças reumatóides e a anormalidades músculo-esqueléticas (DOUGHTY; WALDROP; RAMUNDO, 2000).

A teoria da bainha de fibrina ou *cuff* de fibrina refere-se à polimerização do fibrinogênio em fibrina insolúvel em torno dos capilares da derme, impedindo as trocas de elementos fundamentais (oxigênio, metabólitos, sangue, nutrientes, etc). Esse fato leva ao endurecimento dérmico (lipodermatoesclerose ou lipoesclerose), decorrente de anóxia tecidual, ocasionada pela hipertensão venosa constante devido a manutenção elevada das pressões nas veias superficiais durante a deambulação (DOUGHTY; WALDROP; RAMUNDO, 2000; ETUFUGH & PHILLIPS, 2007).

A teoria dos leucócitos estabeleceu que, na presença da hipertensão venosa, ocorre diminuição na velocidade do fluxo sanguíneo, permitindo o agrupamento de células brancas na parede do endotélio. A obstrução vascular leva à isquemia tecidual local e bloqueio da passagem de oxigênio pelas hemácias. A liberação de mediadores inflamatórios consequentes a esse processo causa danos celulares, morte tecidual e formação de úlceras venosas (DOUGHTY; WALDROP; RAMUNDO, 2000).

A teoria mecânica ou clássica discorre sobre a formação de trombos e a cronificação da inflamação tissular. A hipertensão venosa aumenta o gradiente de pressão entre a artéria e o sistema venoso, resultando na redução da perfusão capilar, fluxo capilar e pressão de difusão. Com a alteração das pressões do leito capilar, ocorrem o edema, o aumento de fibrinogênio plasmático e a diminuição da fibrinólise, estando os dois últimos contribuindo para a hiperviscosidade intravascular com formações de tampões de leucócitos e plaquetas. As alterações hemodinâmicas e linfodinâmicas no membro afetado permitem a passagem de elementos

sanguíneos responsáveis por uma série de alterações cutâneas (DOUGHTY; WALDROP; RAMUNDO, 2000).

A teoria da migração de fatores de crescimento descreve que os fatores de crescimento alojam-se na bainha de fibrina, ficando impedidos de atuarem na reparação normal do tecido epitelial (FURTADO, 2003).

A úlcera venosa decorre principalmente do extravasamento de fluidos e consequente liberação de fibrina para os espaços intersticiais, levando à deficiência no suprimento de oxigênio e nutrientes. Inicia-se espontaneamente ou em decorrência de trauma, tem forma irregular, na maioria das vezes se localiza na face medial da perna, próximo ao maléolo medial (FRANÇA & TAVARES, 2003; CARMO et al., 2007).

As úlceras venosas podem ser classificadas da seguinte maneira (EWMA, 2003):

A) - úlcera venosa sem complicação, avaliada por meio do índice tornozelo-braço (ITB) e obtido resultado  $>$  que 0,8;

B) - úlcera venosa com complicação, avaliada por meio do ITB sendo este  $<$  que 0,8.

As úlceras venosas com complicação são subdivididas em úlceras mistas, que podem apresentar moderado comprometimento arterial, mas com predominância de características de úlceras venosas, tendo valores de ITB entre 0,5 a 0,8, e úlceras com elevada complicação arterial, com ITB abaixo de 0,5.

De acordo com a *Conferencia Nacional de Consenso sobre las úlceras de la extremidad inferior* (CONUEI), para a classificação de uma úlcera em venosa recomenda-se que a lesão apresente os seguintes sinais clínicos: localização em zona lateral interna e terço distal da perna, morfologia redonda ou oval, bordas abauladas, área perilesional com dermatite ocre, hiperqueratose e atrofia branca, queixa de dor, presença de pulsos tibiais e ITB > 0,75 (CONUEI, 2009).

### ***Processo de cicatrização de úlcera de perna e infecção***

A cronificação de uma ferida envolve vários fatores na estagnação do processo de cicatrização e dentre eles, está a presença de micro-organismos da microbiota da pele e os transitórios patogênicos (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001).

Para que o processo da reparação tecidual aconteça de maneira ordenada, é necessário que ocorra hemostasia, inflamação, proliferação e maturação. Nas feridas crônicas, ocorre um retardo na fase inflamatória devido a alterações na expressão da matriz extracelular (EMC) com falhas na reepitelização e prolongamento da inflamação, devido a desproporção de enzimas protetoras e deteriorativas, fazendo com que haja degradação da ferida (SHULTZ et al., 2003; FERREIRA et al., 2006)

Com o excessivo número de células inflamatórias, o perfil de citocinas na ferida é afetado. Isso leva a: aumento na concentração de fator transformador de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ); redução na concentração de fatores que promovem a proliferação, inclusive de fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas (PDEGF); redução de deposição



de matriz que as transformam em fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MENKE et al., 2007).

Portanto, a atividade mitogênica das células é reprimida nas feridas crônicas, e a inflamação patogênica resulta em uma descontrolada cadeia que leva a mais inflamação. Como resultado da inflamação, observa-se o aumento do número e atividade dos neutrófilos, hipersíntese, degradação de fibroblastos e queda na quantidade de proteases de colágeno, o que previne a maturação e a formação da cicatriz, constituindo um círculo vicioso da fase inflamatória (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005; MENKE et al., 2007).

Nas extremidades corporais onde há comprometimento vascular e acometimento do aporte de oxigênio, o influxo de neutrófilos e macrófagos ativados para essa região aumenta a demanda por oxigênio com consequente elevação das concentrações de ácido láctico e queda do pH. Essa combinação entre hipóxia, pH baixo e alta concentração de ácido láctico ativa o macrófago para a produção de fatores de crescimento (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

O descontrole lítico pode resultar em prejuízo à evolução do reparo, uma vez que as células inflamatórias ativadas são produtoras de outras substâncias letais sobre as membranas celulares. Alguns mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ ), embora mitogênicos para fibroblastos, podem induzir a morte descontrolada das células. Durante a evolução do reparo, é comum haver momentos em que a lise predomine sobre a reposição e vice-versa, levando a cronificação da lesão. Os mediadores químicos, interleucinas seis e dez (IL-6, IL-10) são reduzidos,

consequentemente há uma desordem nos níveis dos mediadores inflamatórios, resultando em declínio de queratinócitos e defeitos na EMC, dessa maneira retardando a cicatrização (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A presença de mais de um gênero de micro-organismos na lesão interferem na concentração de IL-6 com conseqüente alteração no processo cicatricial úlceras venosas e arteriais de membros inferiores (AMBROSCH; LOBMAN; POTT; PREIBLER, 2008).

Quando ocorrem os processos infecciosos, as bactérias contribuem para a cronificação de lesões por meio da produção de toxinas, elevando a quantidade de citocinas pró-inflamatórias. As exotoxinas produzidas em comum, pelas bactérias, atacam as células produzindo necrose tecidual. Elas contribuem ainda para a diminuição das proteínas que favorecem quimiotaxia, aumentam a produção de enzimas citotóxicas e dos radicais livres e acentuam a hipóxia promovendo aumento da lesão tecidual (JONES; EDWARDS; THOMAS, 2004), decorrente da competição entre células do hospedeiro e das bactérias por oxigênio e nutrientes (OVINGTON, 2003). A infecção prejudica as atividades dos fibroblastos na produção de colágeno e ocasiona um desequilíbrio do processo (DEALEY, 2008).

### ***Identificação de infecção em feridas crônicas de perna***

Os sinais e sintomas clássicos de infecção em feridas são reconhecidos como marcadores desde a década de 50 (EWMA, 2005). No entanto, a identificação de uma ferida infectada requer diferentes

abordagens, e não há consenso sobre o diagnóstico de infecção (KINGSLEY, 2001; CUTTING, WHITE, 2005).

As abordagens descritas têm sinalizado as melhores condutas para o diagnóstico de infecção de feridas, sendo elas: avaliações clínicas (identificação de sinais clássicos de infecção, identificação de sinais adicionais de acordo com escores de classificação) e a análise microbiológica (GARDNER; FRANTZ; DOEBBELING, 2001; EWMA, 2005; WHITE & CUTTING, 2006; COOPER et al., 2009).

Em estudo realizado por Gardner; Frantz; Doebbeling, (2001), testou-se a sensibilidade, especificidade e valor preditivo dos sinais clássicos de infecção – dor, eritema, edema, calor, exsudato purulento e dos sinais específicos para cicatrização em feridas por segunda intenção – exsudato seroso, cicatrização sem avanço, descoloração ou granulação friável, tunelização, odor fétido e rompimento da ferida, mediante um *checklist* denominado: *Clinical Signs and Symptoms Checklist* (CSSC). Observou-se que os sinais com melhor predição para infecção foram: aumento da dor, presença de granulação friável, odor fétido e tunelização, estando 11 (30,5%) das lesões infectadas.

Num processo de identificação de consenso entre especialistas de várias profissões, definiu-se os critérios para identificação de infecção em diversas feridas, dentre elas a úlcera venosa. Instituíram-se chaves de classificação ou escores de concordância para cada sinal ou sintoma: alto, com escore entre 8 e 9, médio, entre 6 e 7 e baixo entre 4 e 5. Em relação às úlceras venosas, os escores entre 8 e 9, considerados altos, foram

obtidos para os seguintes sinais e sintomas: celulite, odor fétido, dor, cicatrização sem evolução, aumento do exsudato e rompimento da ferida (EWMA, 2005).

Embora estudos apontem quais os sinais e sintomas preditores de infecção, tem sido recomendado que as úlceras venosas sejam avaliadas de acordo com o estágio clínico de infecção, para que seja instituída terapêutica adequada. A análise microbiológica e o uso de antimicrobiano sistêmico são sugeridos a partir da observação de deteriorização dos tecidos da lesão, presença de celulite, linfangite ou alteração no estado geral do paciente como febre e septicemia (EWMA 2006).

Estudos realizados no Brasil sobre feridas crônicas têm abordado os resultados das análises microbiológicas, sem deixar claro quais critérios utilizados para a indicação do exame microbiológico (VERA et al., 2006; FERNANDES; PIMENTA & FERNANDES, 2007).

Em estudo realizado em Goiânia-GO, cujo objetivo foi analisar a ocorrência de infecção em feridas crônicas por meio de *swab*, verificou-se que, das 60 feridas analisadas de usuários atendidos em Unidades Básicas com atendimento 24 horas, 45 (75%) das lesões estavam infectadas (MARTINS, 2008).

Gomes, Carvalho e Lima, (2009) em estudo cujo objetivo foi avaliar a variação da microbiota de feridas crônicas de membros inferiores (destacando-se as úlceras venosas), utilizaram-se da avaliação clínica e da coleta de espécime para cultura por meio de *swab*; verificaram que nenhuma

das lesões apresentava sinais de infecção, mas estavam todas colonizadas por mais de uma espécie de micro-organismos.

A coleta de espécimes para análise microbiológica auxilia na identificação dos micro-organismos mais prevalentes, na detecção de fenótipos de resistência aos antimicrobianos e no estabelecimento de terapêutica adequada (FRANK; BAYOUMI; WESTENDORP, 2005).

Estudos sobre significância microbiológica por meio de biópsia verificaram que o limiar de  $10^5$  UFC/g (unidades formadoras de colônias/grama de tecido) é suficiente para inferir se a lesão está infectada (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; BOWLER, 2003).

O limiar de colônias bacterianas para diagnóstico de lesão infectada tem sido discutido, pois há micro-organismos que apresentam elevada patogenicidade, como por exemplo: *Streptococcus  $\beta$ -hemolítico do grupo A*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, *Corynebacterium diphtheriae* dentre outras, além de algumas espécies de fungos. Não há consenso sobre esse tema. Há concordância, entre os autores, no que se refere ao aumento da carga microbiana como um dos fatores intervenientes no processo de cicatrização das feridas crônicas (DOW, 2003; BOWLER, 2003).

Em estudo de revisão da literatura, foram comparadas várias pesquisas que quantificaram a carga microbiana por meio do *swab*, e de biópsia da lesão. Dentre os estudos apontados, observou-se que, utilizando o *swab* para a coleta, o limiar foi  $>10^5$  UFC/g, enquanto que para biópsia o resultado

foi  $\geq 10^4$  UFC/g (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; BOWLER, 2003; WHITE, CUTTING, 2006).

Em avaliação microbiológica de úlceras venosas crônicas, as quais não apresentavam sinais clínicos de infecção, foram realizadas coletas de espécimes por meio de *swab* e biópsia. O estudo revelou não ser estatisticamente significativa a utilização de biópsia justificando ser viável a utilização de *swab* (DAVIES et al., 2007).

Uma investigação clínica e microbiológica de úlceras venosas utilizou de três técnicas para a obtenção dos espécimes (*swab*, discos e biópsia) e os compararam em relação à carga microbiana. Verificaram que a coleta por meio de biópsia, em relação aos discos, apresentou diferença estatisticamente significativa, e que não ocorreu significância estatística ao comparar a coleta por *swab* e a biópsia, mostrando que é justificável o uso da técnica não invasiva, como *swab*, para a identificação de infecção em úlceras venosas (COOPER et al., 2009).

### ***Agentes de infecção em feridas crônicas***

As feridas crônicas são na maioria das vezes contaminadas e/ou colonizadas por diversos micro-organismos (LANDIS, 2008), e a presença de múltiplos micro-organismos nas úlceras tem sido analisada, bem como a relação destes no restabelecimento dessas lesões (SANTOS; SILVEIRA; CAFARRO, 2006; HØGSBERG et al., 2011).

Diversos gêneros de bactérias interferem significativamente na reparação da lesão. Identificou-se, em úlceras venosas, a presença de

*Pseudomonas* sp. em 20%, *Enterobacteriaceae* em 40%, estando os gêneros *Escherichia* e *Proteus* com predominância entre os demais (AMBROSCH; LOBMAN; POTT; PREIBLER, 2008).

Estudo realizado em pacientes com úlceras diabéticas, cujo objetivo foi identificar e quantificar os fatores de risco para amputação do membro inferior, verificou que, das 118 culturas realizadas, 33,1% foram positivas para micro-organismos Gram-negativos com destaque para *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa* e 26,3% para Gram-positivos destacando-se o *Staphylococcus aureus* (SANTOS; SILVEIRA; CAFARRO, 2006).

Outro estudo observou que na presença de *Pseudomonas aeruginosa* em úlceras venosas, há considerável impacto na rejeição parcial ou total do enxerto, interferindo no tratamento (HØGSBERG et al., 2011).

Em avaliação sobre a microbiota de feridas crônicas de membros inferiores, cujas lesões predominantes foram úlceras venosas, verificou-se, com maior frequência, (65,6%) micro-organismos Gram-negativos dos gêneros *Proteus*, *Pseudomonas* e *E. coli* (GOMES; CARVALHO; LIMA, 2009).

Investigação para verificar a presença de infecção em úlceras venosas por meio de análise microbiológica identificou *Corynebacterium striatum* e *Staphylococcus aureus* em 75% das lesões; *Pseudomonas aeruginosa* em 60% e *Streptococcus* sp. em 45% das lesões (COOPER et al., 2009).

Em outro estudo sobre a avaliação de úlceras venosas para caracterização da microbiota verificou-se a presença de 53% de bactérias Gram-positivas, 51,5% de bactérias anaeróbias facultativas e 30% de anaeróbias estritas. Entre as bactérias Gram-negativas (47%) foram identificados os gêneros *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Proteus* e *Serratia* (WOLCOTT et al., 2009).

Observa-se de um modo geral que as feridas crônicas de pele são colonizadas por bactérias Gram-negativas (MARTINS, 2008), especialmente as pertencentes a família Enterobacteriaceae e ao grupo dos bastonetes Gram-negativos não-fermentadores (BGNNF). Estes têm tido destaque na literatura não só por interferirem no processo de cicatrização das úlceras (AMBROSCH; LOBMAN; POTT; PREIBLER, 2008; HØGSBERG et al., 2011), mas também por apresentarem mecanismos de resistência aos antimicrobianos (SALGADO et al., 2011; MELO; BARBARESCO; GONTIJO FILHO, 2011; FERREIRA et al., 2011; MOREIRA et al., 2011; LEÃO et al., 2011), interferindo de maneira substancial na resposta terapêutica dos sujeitos acometidos por esses agentes patogênicos.

### **Família *Enterobacteriaceae* (enterobactérias)**

Os membros da família *enterobacteriaceae* são considerados micro-organismos fermentadores por utilizarem a fermentação de glicose como fonte de energia. Estão amplamente distribuídos no solo, água, plantas e no trato intestinal de humanos e animais (KONEMAN et al., 2008, TRABULSI, 2008).



As enterobactérias constituem o maior e mais heterogêneo grupo de bastonetes Gram-negativos clinicamente importantes, sendo responsáveis por mais de 95% de todas as infecções. Essas bactérias compartilham uma variedade de fatores de virulência (lipopolissacarídeos – LPS, cápsula, flagelo, fímbrias) e têm-se destacado pela multirresistência aos antimicrobianos, principalmente pela produção de beta-lactamases (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2006).

Nesse contexto, têm particular importância os agentes que produzem beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) e beta-lactamase AmpC. Atualmente, a produção de outro tipo de beta-lactamase, as carbapenemases, também tem sido relatada com significativa preocupação (ANVISA, 2010).

Vários gêneros e espécies já foram descritos, sendo estes diferenciados por meio de seu perfil bioquímico em meios de cultura especiais. Os membros dessa família são anaeróbios facultativos, fermentam glicose, citocromo-oxidase negativos e reduzem nitrato a nitrito. Os seguintes gêneros são de interesse para este estudo: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* (KONEMAN et al., 2008).

*Escherichia coli* é um micro-organismo comensal, habita o intestino humano durante toda a sua vida e patogênico por estar associada a doenças infecciosas (BUERIS et al., 2005). Dentre as doenças causadas por esse bastonete estão: infecções do trato urinário, meningite neonatal, gastroenterites, choque provocado por endotoxinas, sepse (JAWETZ,

MELNICK; ALDEBERG, 2009; KONEMAN et al., 2008) e infecção de feridas, incluindo as de membros inferiores (SANTOS; SILVEIRA; CAFFARO, 2006; MARTINS, 2008; QUEGE, 2008), dentre outras.

*E. coli* é a espécie mais comumente isolada nos laboratórios clínicos e já foi associada a infecções de todos os tecidos e sistemas orgânicos humanos. Esta bactéria apresenta ampla diversidade antigênica, é resistente a vários antimicrobianos tradicionalmente utilizados e tem sido relacionada a infecções adquiridas na comunidade, como também as associadas aos cuidados em saúde (IACS) (VILLAS BÔAS & RUIZ, 2004; JAWETZ; MELNICK; ALDEBERG, 2009).

O gênero *Citrobacter* contempla 12 espécies sendo a mais citada na literatura a *C. freundii*. São encontradas predominantemente em amostras de fezes (KONEMAN et al., 2008; DSMZ, 2012) e, em menor escala, em feridas crônicas (MARTINS, 2008).

A *C. freundii*, produtora de enzima carbapenemase, tem sido isolada e reportada como um agente de infecção cruzada no ambiente hospitalar (CHEN et al., 2011; KANAMORI et al., 2011). Esse micro-organismo é causa comum de infecção em neonatos e em pacientes imunocomprometidos (CHEN et al., 2011).

O gênero *Klebsiella*, quando isolado em meios de cultura seletivos, apresenta colônias grandes e mucóides, sendo esta última uma evidência da presença de cápsula. Esse fator de virulência está diretamente relacionado a formação de biofilme, o que dificulta a ação de antimicrobianos e do sistema imunológico (KONEMAN et al., 2008).

As espécies desse gênero mais comumente citadas na literatura são a *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* (KONEMAN et al., 2008). A *K. pneumoniae* está associada principalmente a quadros de pneumonias primárias, mas também a infecções extrapulmonares como enterites, meningites, sepses, infecções do trato urinário (KONEMAN et al., 2008) e feridas crônicas (BOWLER; DUERDEN; ARMSTRONG, 2001; BOWLER, 2003; HOWELL-JONES, 2005; MARTINS, 2008).

Em estudo sobre fatores de risco para amputações de membros inferiores (MMII) em pacientes diabéticos, identificou-se que a presença de bastonetes Gram-negativos nas lesões estava associada a um maior número de amputações. Dentre os micro-organismos citados encontra-se a *Klebsiella pneumoniae* em nove (7,6%) das culturas positivas das lesões avaliadas dos MMII (SANTOS; SILVEIRA; CAFFARO, 2006).

O gênero *Enterobacter* inclui aproximadamente 24 espécies, sendo a *E. aerogenes* a mais frequentemente isolada de amostras biológicas. Esse micro-organismo está associado a diversas infecções oportunistas das vias urinárias, trato respiratório e feridas cutâneas, podendo causar a seps e meningites. Já a *E. gergoviae*, além de provocar infecções urinárias, também tem sido isolada de amostras a partir do trato respiratório e sangue (KONEMAN et al., 2008; DSMZ, 2012).

A *Pantoea agglomerans*, denominada até a década de 70 por *Enterobacter agglomerans*, é a espécie mais importante do gênero (KONEMAN et al., 2008). Isolada do meio ambiente e de seres humanos,

tem sido responsável por surtos de infecções associadas aos cuidados em saúde (BICUDO et al., 2007).

As espécies do gênero *Proteus* apresentam motilidade característica e crescimento de forma disseminada, decorrente da presença de flagelos. A espécie *P. mirabillis* é agente infectante de feridas humanas, bem como de infecções urinárias. Já a *P. vulgaris* é isolada principalmente de imunossuprimidos em uso prolongado de antimicrobianos (KONEMAN et al., 2008).

Estudo realizado em pessoas curadas de hanseníase que apresentavam úlceras de perna, identificou-se que o *P. vulgaris* era um dos agentes infectantes das lesões (QUEGE, 2008).

Pesquisa sobre micro-organismos de úlceras crônicas de pernas verificou que dentre os três isolados de maior frequência estavam o *P. mirabillis* 16,6% e *P. vulgaris* 15,0% (MARTINS et al., 2010).

Em relação ao gênero *Morganella*, este é composto pela espécie *M. morganii* que, diferente dos demais gêneros citados, diferencia-se em duas subespécies (*morganii* e *sibonii*). Esse micro-organismo provoca infecções urinárias e de feridas, além de gastroenterites. Doença grave por ser relatada principalmente em indivíduos imunocomprometidos (KONEMAN et al., 2008).

Em investigação para avaliar a prevalência de micro-organismos em úlceras venosas de usuário de bota de Unna, verificou-se a presença de

enterobactérias e, dentre elas, *Morganella morganii* e *Providencia rettgeri*, as quais dificultam o processo de cicatrização (VICENTIM et al., 2009).

*Providencia* é um gênero constituído por nove espécies. Infecções por essa bactéria não são comuns e está limitada a casos isolados, especialmente em infecções do trato urinário (KONEMAN et al., 2008; DSMZ, 2012).

### **Bastonetes Gram-negativos Não fermentadores (BGNNF)**

O grupo dos bastonetes Gram-negativos não fermentadores é constituído por várias famílias, gêneros e espécies com diferentes propriedades fisiológicas, metabólicas e patogênicas. Estes, ao contrário das enterobactérias, são caracterizados por não utilizarem carboidrato como fonte de energia ou o degradarem por outra via metabólica como a oxidação (KONEMAN et al., 2008).

A identificação desses micro-organismos representa um desafio para a rotina bacteriológica devido à complexidade e elevado custo dos esquemas de classificação. Entre os micro-organismos de interesse clínico estão: *Acinetobacter* spp., *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas* sp. e *Stenotrophomonas* spp. (ANVISA, 2004).

Os BGNNF têm recebido especial destaque particularmente pela resistência aos vários antimicrobianos disponíveis, e pela capacidade de causar infecções graves em pacientes imunocomprometidos. Os principais mecanismos de resistência estão relacionados à produção de enzimas como

metalo-beta-lactamase e beta-lactamase tipo AmpC (YONG et al., 2002; MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005; FIGUEIREDO et al., 2009);

Nesse grupo, o gênero *Pseudomonas* é de grande relevância para o contexto das doenças infecciosas, sendo representado por bactérias móveis com flagelos polares, retas ou ligeiramente curvas, aeróbias estritas, que utilizam carboidrato por oxidação e são citocromo oxidase-positivas. As espécies mais frequentemente isoladas de amostras clínicas são *P. aeruginosa*, *P. stutzeri* e *P. fluorescens* (JAWETZ; MELNICK; ALDEBERG, 2009).

*P. aeruginosa* é uma bactéria invasiva e toxigênica. Habita vários ambientes, preferencialmente locais úmidos, podendo também ser encontrada no intestino humano. As infecções por esse agente são observadas em sítios onde existe acúmulo de umidade. Pode causar infecções pulmonares, ósseas, do trato urinário, de pele e sepse. As infecções de pele geralmente estão associadas à água contaminada (LEVIN; ARRUDA; OLIVEIRA, 2005).

As colônias de *P. aeruginosa* são caracterizadas pela produção de pigmento azulado ou esverdeado característico (piocianina e pioverdina), e odor semelhante a uva (KONEMAN et al., 2008). Além disso, essa bactéria possui vários fatores de virulência responsáveis pela colonização e infecção no hospedeiro: LPS, pili, exotoxina A, leucocidina, proteases, fosfolipases, entre outros (MADIGAN et al., 2010) .

Alguns isolados produzem um polissacarídeo capsular denominado alginato. Essa substância envolve a célula bacteriana e auxilia no processo

de adesão ao tecido do hospedeiro e formação de biofilme. Os biofilmes microbianos são consórcios de micro-organismos embutidos em uma massa de polímeros extracelulares (PEC) e aderidos a uma superfície. A formação de biofilmes em úlceras constitui um fator agravante para o tratamento, pois este é altamente resistente a ação de agentes biocidas e do sistema imunológico (MADIGAN et al., 2010).

### ***Desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos***

#### **Resistência bacteriana aos antimicrobianos**

A resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema mundial e de crescente preocupação para a saúde (ROSSI, 2011). Infecções, incluindo as de úlceras crônicas por bactérias resistentes, também ocorrem devido a assistência recebida nas instituições de saúde. Nesse contexto, os profissionais da área da saúde, os artigos médico-hospitalares, equipamentos e ambientes funcionam como veículos de transmissão de micro-organismos virulentos e multirresistentes (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009; CHEN et al., 2011).

Entre os eventos que levam ao desenvolvimento e disseminação de resistência, pode-se destacar o uso indiscriminado de antimicrobianos pela automedicação e pela prescrição médica, muitas vezes sem caracterização do agente. Tais condições têm gerado pressão seletiva sobre as bactérias e consequente seleção de exemplares multiresistentes e, atualmente, também panresistentes, ou seja, que apresentam resistência comprovada *in vitro* a

todos os antimicrobianos testados em exame microbiológico (ROSSI & ANDREAZZI 2005; FONSECA et al., 2010; ANVISA 2010).

O desenvolvimento de novas classes de antimicrobianos acompanhou e por vezes ficou à frente das bactérias clinicamente relevantes em relação ao desenvolvimento de resistência (ROSSI & ANDREZZI, 2005). Porém, a difusão do uso de antimicrobianos fez com que essa situação não perdurasse por muito tempo, pois os agentes patogênicos bacterianos desenvolveram mecanismos que interferiram nas tentativas de resolução do problema.

As bactérias podem apresentar resistência basicamente por duas formas: de maneira intrínseca ou adquirida. A forma intrínseca, também conhecida como natural, é uma característica biológica de alguns grupos de bactérias, sendo gênero ou espécie-específica (BARROS et al., 2001; ROSSI & ANDREAZZI, 2005; JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009).

O desenvolvimento de resistência intrínseca é resultado de genes cromossômicos que codificam na célula bacteriana estruturas ou mecanismos que impedem o antimicrobiano de agir, como: falta de afinidade da droga para o alvo bacteriano; inacessibilidade da droga a célula bacteriana; extrusão/efluxo da droga por bombas de efluxo (cromossomicamente codificados) e produção de enzimas que inativam as drogas (TAVARES, 2002, BARROS et al., 2003). Exemplo de bastonete Gram-negativo com resistência intrínseca é *Klebsiella* sp. resistente à ampicilina decorrente de beta-lactamases (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).



A resistência adquirida decorre de modificações na estrutura ou no funcionamento da célula que bloqueiam a ação dos antimicrobianos. Tais modificações surgem a partir de alterações genéticas como mutações ou processos de recombinação (conjugação, transdução, transformação, transposição) (TAVARES, 2002). De acordo com a localização dos genes, a resistência pode ser cromossômica ou extra-cromossômica (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 2009). Exemplo de bastonete Gram-negativo com resistência adquirida é a *Pseudomonas* sp. resistente aos carbapenems (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Os principais mecanismos bacterianos de resistência são: alteração de permeabilidade da membrana (transporte), alteração do sítio de ligação (alvo), efluxo ativo do antimicrobiano (bomba de efluxo) e inativação enzimática (BARROS et al., 2001).

A alteração de transporte ocorre por meio do invólucro bacteriano decorrente da inibição do transporte pela diminuição da entrada de antibiótico na bactéria. Isso acontece de duas maneiras: por redução da permeabilidade da membrana ou por efluxo ativo de antibióticos que o remove de dentro da célula. É um mecanismo comum em bastonetes Gram-negativos, devido à barreira para a entrada do antibiótico na célula bacteriana ser a membrana externa. Nessas bactérias, os antibióticos entram por meio da membrana através de proteínas denominadas porinas. Em virtude de mutações, as porinas podem ter sua produção reduzida ou alteração estrutural impedindo assim a entrada do antibiótico (BARROS et al., 2001).

Quanto à alteração do sítio de ligação, esta ocorre porque o sítio de ação do antibiótico é alterado, passando a ter baixa afinidade pela droga antibacteriana, com perda da atividade antimicrobiana (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Entre os mecanismos de resistência dos bastonetes Gram-negativos (BGN), a produção de enzimas beta-lactamases tem recebido especial destaque devido à sua emergência, tanto na comunidade quanto nos serviços de saúde, e limitação terapêutica (ROSSI & ANDREAZZI, 2005; TORRES et al., 2006; ROSSI, 2011; VASQUES et al., 2011; VILLEGAS, et al., 2011).

### **Produção de Beta lactamases**

A inativação enzimática é o principal mecanismo de resistência adquirida ao grupo de antimicrobianos denominado beta-lactâmicos. Pertencem a essa classe as penicilinas, cefalosporinas, carbapenens e monobactams. Todos apresentam em comum, no seu núcleo estrutural, o anel beta-lactâmico, o qual confere atividade bactericida (TAVARES, 2002).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico e, conseqüentemente, inativar o antimicrobiano. Catalisam a hidrólise de amidos, amidinas e outras ligações entre C e N, separando a base do substrato (ROSSI & ANDREAZZI, 2005). A produção de  $\beta$ -lactamases é codificada por genes situados no cromossomo bacteriano ou em plasmídios e transposons, sendo, portanto, transferidos entre diferentes bactérias (BARTH, BARROS, MACHADO, 2003).

A produção de  $\beta$ -lactamases representa um importante mecanismo de resistência dos BGN aos  $\beta$ -lactâmicos. A resistência está diretamente relacionada à quantidade de enzima produzida, à habilidade da enzima hidrolizar o antimicrobiano e à velocidade com que o  $\beta$ -lactâmico penetra pela membrana externa (SADER, 2005).

Nas bactérias Gram-negativas, as  $\beta$ -lactamases permanecem no espaço periplasmático entre a membrana citoplasmática e a membrana externa. Essas enzimas acumulam-se nesse local, e os  $\beta$ -lactâmicos precisam então atravessá-lo para atingir seus receptores localizados na membrana celular. Uma vez presentes em altos níveis, essas enzimas impedem a chegada do antimicrobiano no sítio ativo (SADER, 2005).

Devido à sua diversidade e a identificação de novas enzimas, ao longo dos anos, as  $\beta$ -lactamases receberam diferentes esquemas de classificação. Ambler (1980), propôs a classificação molecular em quatro classes designadas A, B, C e D, com base na sequência genética. Busch (1989), agrupou as enzimas de acordo com suas características funcionais (substratos e suscetibilidade de inibição) em quatro grupos: 1, 2, 3 e 4.

Uma nova reorganização foi proposta por Busch, Jacoby e Medeiros (1995), dando origem a subgrupos para melhor caracterização das diferentes enzimas: 2a, 2b, 2be, 2br, 2c, 2d, 2e, 2f.

## ***Mecanismos de resistência dos bastonetes Gram-negativos e o impacto clínico***

As  $\beta$ -lactamases da classe C, as AmpC, são produzidas em algum grau por todas as bactérias Gram-negativas, e diversas são as bactérias que apresentam habilidade para o desenvolvimento de mecanismos de resistência. Dentre elas, encontram-se as enterobactérias das espécies *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *Enterobacter* spp., *Providencia* spp. e *M. morganii* que possuem o gene cromossômico para  $\beta$ -lactamase, podendo ser constitutivo ou induzido por antimicrobianos (OPLUSTIL et al., 2004). A presença do gene de indução está relacionada a resultado de falsa sensibilidade na realização dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (KONEMAN et al., 2008).

A *E. coli* apresenta resistência de modo constitutivo e baixa expressão de enzima tipo AmpC. Não ocorre expressão de outras  $\beta$ -lactamases, estas são geralmente sensíveis à ampicilina, cefalotina e cefalexina (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* também são resistentes de forma cromossômica-constitutiva e, ao liberarem  $\beta$ -lactamases em nível baixo, apresentam resistência à ampicilina, à amoxacilina e às carboxipenicilinas (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Em investigação para caracterizar o fenótipo e genótipo de micro-organismos isolados de pacientes admitidos em uma unidade de terapia intensiva coronariana, identificou-se que 21,95% estavam colonizados por

*E.coli* e 34,1% por *K. pneumoniae*. Em 58%, o genótipo de resistência foi confirmado e dentre os genes mais prevalentes encontrava-se o de AmpC (50%) (VASQUES et al., 2011).

Já as bactérias do Grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.* e *Providencia spp.*) e *Morganella morganii* produzem beta-lactamase tipo AmpC de expressão induzível. Para esses micro-organismos a indução à produção de  $\beta$ -lactamases ocorre na exposição aos antimicrobianos ampicilina, amoxacilina, cefalosporinas de curto espectro e cefoxitina, levando a seleção de bactérias resistentes a essas drogas (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Mecanismos de resistência similares aos encontrados em enterobactérias, os quais regulam a expressão da  $\beta$ -lactamase AmpC, estão presentes em BGNNF. Dentre eles, uma das bactérias que merece atenção na realização de exames microbiológicos devido ao seu impacto clínico é a *P. aeruginosa*. Com a *P. aeruginosa* pode ocorrer o fenômeno da indução, o qual desencadeia um aumento da produção da enzima  $\beta$ -lactamase pela presença do  $\beta$ -lactâmico; e quando esse é retirado, a  $\beta$ -lactamase pode ser sintetizada em quantidades menores pela bactéria. Isso faz com que não seja verificado, a priori, de modo exato, perfil de sensibilidade do micro-organismo quando realizado o teste por meio de disco-difusão. Dentre os  $\beta$ -lactâmicos, a cefoxitina é um potente indutor (SADER, 2005).

Há outros dois grupos de  $\beta$ -lactamases, conhecidos como  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs).

As ESBL são enzimas não-induzíveis e transmitidas por meio de plasmídeos. Os micro-organismos produtores dessa enzima apresentam resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro como as cefalosporinas de terceira geração (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e monobactâmicos como o aztreonam. Não apresentam resistência à cefoxitina, imipenem e meropenem (ROSSI & ANDREAZZI, 2005). Os micro-organismos geralmente reportados como produtores desta enzima são a *K. pneumoniae* e a *E. coli*, sendo esses encontrados geralmente em unidades de terapia intensiva (UTI) (DALMARCO; BLATT; CÓRDOVA, 2006).

Com a realização do antibiograma tradicional, não é possível a detecção de cepas produtoras de ESBL, sendo necessária a realização de testes adicionais (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

Quanto às MBLs, estas atuam sobre as penicilinas, cefalosporinas e cabapenêmicos, não sendo inibidas pelo ácido clavulânico, e sim pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (ROSSI & ANDREAZZI, 2005) e o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005). Um dos micro-organismos de grande importância clínica, referido na literatura como produtor de MBLs é a *P. aeruginosa* por apresentar resistência em torno de 50% ao imipenem (YONG et al., 2002).

Assim como outros micro-organismos produtores de  $\beta$ -lactamases, a *P. aeruginosa* produtora de MBL tem sido reportada como causa de infecções em ambientes hospitalares, tornando-se um problema mundial (MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005; FIGUEIREDO et al., 2009); e

geralmente está envolvida em infecções de paciente hospitalizado em UTI (TORRES et al., 2006).

Em análise feita para a detecção de MBLs em *P. aeruginosa* em Hospitais de Recife, Pernambuco, verificou-se que 62% destas eram produtoras dessa  $\beta$ -lactamase (MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005).

A detecção de cepas com esse perfil de resistência configura-se em uma problemática com sérias repercussões para a instituição, de uma terapêutica adequada (TORRES et al., 2006).

Diante do exposto, observa-se a magnitude do problema de saúde pública enfrentado. Essa situação reforça a necessidade de mudanças nas políticas públicas de saúde, no que se refere a utilização dos exames microbiológicos e a investigação do perfil de suscetibilidade dos micro-organismos identificados, para instituição de terapêutica adequada, buscando como meta a redução da disseminação de infecção relacionada à assistência à saúde em nível ambulatorial.

## 2 OBJETIVOS

---

### Geral

Analisar os sinais e sintomas de infecção e a ocorrência de bastonetes Gram-negativos em úlceras venosas de pacientes atendidos nas unidades básicas de saúde no município de Goiânia (GO).

### Específicos

- Identificar a ocorrência de Bastonetes Gram-negativos nas úlceras;
- Analisar o perfil de suscetibilidade e resistência dos isolados frente a antimicrobianos frequentemente utilizados na prática e a antibióticos recomendados na prática clínica;
- Detectar a produção de fenótipos de resistência de  $\beta$ -lactamase tipo AmpC,  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL) e Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) nos BGN;
- Descrever sinais e sintomas clínicos de infecção em úlceras venosas de pessoas em tratamento na atenção primária;
- Avaliar o estágio clínico de infecção das lesões;
- Avaliar a relação entre a presença do sinal ou sintoma clínico de infecção e a presença de bastonetes Gram-negativos.



### 3 MÉTODOS

---

Trata-se de um subprojeto aninhado ao projeto de pesquisa “Avaliação de úlceras venosas de estase no contexto do atendimento ambulatorial na rede municipal de saúde de Goiânia: ampliando as perspectivas”, com apoio da FAPEG. Nesse recorte, foi realizado um estudo tipo transversal.

#### 3.1 População e amostra

A população foi constituída por usuários com úlceras venosas com ou sem complicação arterial, atendidos em salas de curativos das unidades da Rede Municipal de Saúde de Goiânia.

Foram elegíveis os sujeitos com:

- Idade igual ou superior a 18 anos;
- Presença de pelo menos uma ferida de origem venosa por um período mínimo de seis semanas;
- Presença de um ou mais sinais ou sintomas de infecção clássicos (GARDNER et al., 2007) ou sugeridos pela *European Wound Management Association* (EWMA, 2005), exceto “cicatrização sem evolução apesar de adequada compressão”, uma vez que no cenário da pesquisa não há fornecimento regular de produtos para terapia compressiva.

Identificou-se 130 pacientes em tratamento para úlcera de perna e abordados 111, em decorrência dos demais não serem assíduos aos

serviços de saúde. Destes, 11 apresentavam apenas úlceras arteriais, e 13 se recusaram a participar do estudo. Após avaliação dos critérios sobre a presença de sinais e sintomas de infecção local em 98 pacientes, foram incluídos 69 (70,4%), sendo todos submetidos à avaliação microbiológica, totalizando 98 úlceras venosas com ou sem complicação arterial.

As perdas 18(18,3%) foram em virtude de não finalização da coleta de dados por desistência dos sujeitos e/ou não comparecimento nos dias agendados.

### **3. 2 Local do estudo**

Em 2010-2011, na Secretaria Municipal de Saúde de Goiânia, havia 108 Unidades Básicas de Saúde (UBS) de atendimento na região metropolitana, distribuídas em sete Regiões Administrativas: as regiões Norte, Noroeste, Leste, Oeste, Sudoeste, Sul e Campinas-Centro.

A rede municipal de serviços de saúde é composta por Unidades de Atenção Básica à Saúde da Família (UABSF), Centros de Saúde (CS), Centros Integrals de Assistência Médico-Sanitária (CIAMS), Centros de Assistência Integral à Saúde (CAIS), Centros de Atenção Psicossocial (CAPS), ambulatórios (A), centros de referências (CR), maternidade (M) e pronto socorro (PS).

Buscou-se identificar, dentre aquelas que estavam em funcionamento, as unidades de atendimento ambulatorial à pessoa com ferida crônica. Identificou-se na Rede Municipal de Saúde, entre as 108 unidades, 60 salas de curativos e, destas, 49 prestavam atendimento as pessoas com feridas

crônicas. Assim, a pesquisa foi realizada nas salas de curativos de 19 UABSF, 14 CS, 04 CIAMS, 11 CAIS e 01 centro de referência.

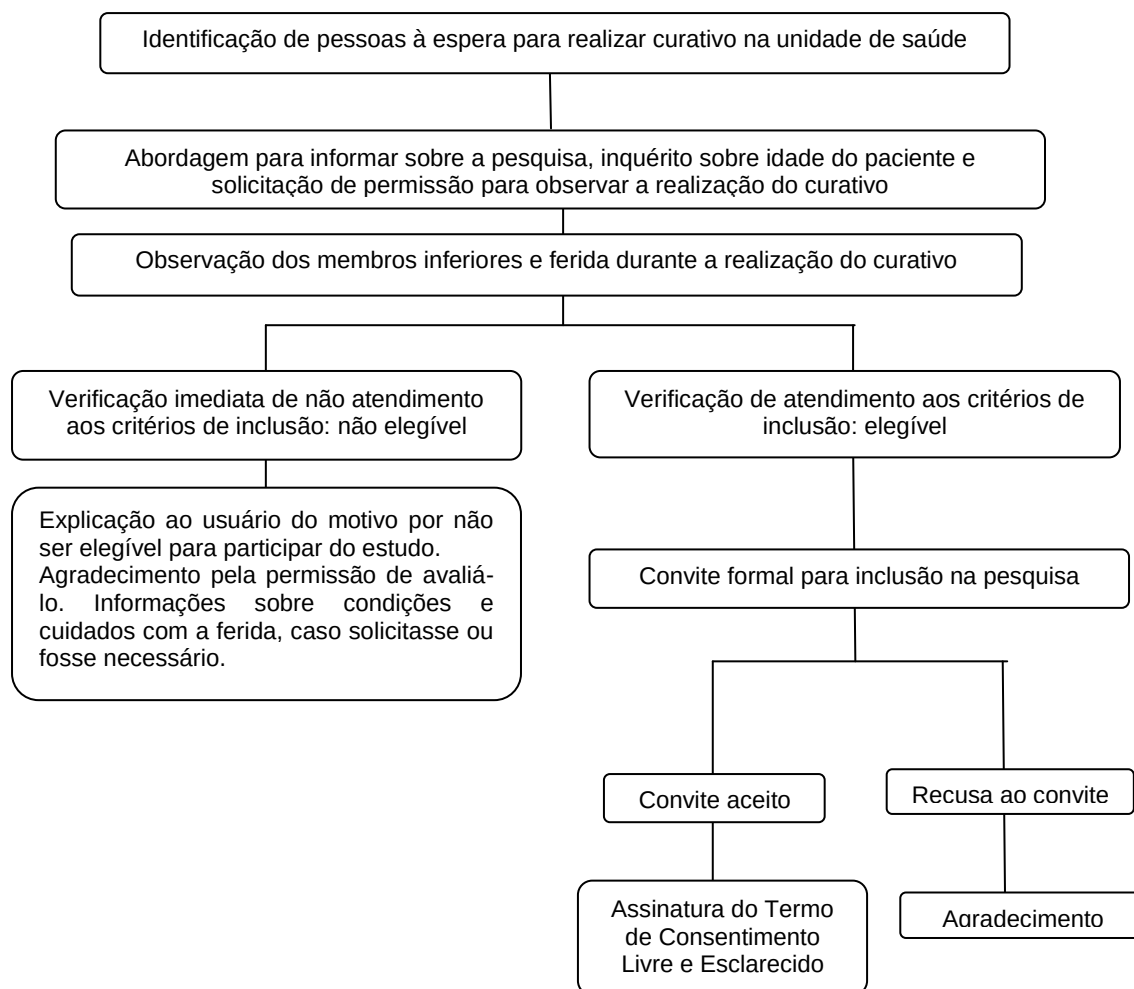
Inicialmente solicitou-se autorização dos Diretores das unidades de saúde, para utilização das salas de curativos. Após, foram agendados os dias e horários, para observação do atendimento realizado nas salas de curativos.

Verificou-se que o atendimento nas salas de curativo em geral acontecia por demanda espontânea, exceto nas unidades de referência, que recebem casos de maior complexidade, encaminhados das demais unidades.

### **3.3 Identificação dos possíveis participantes e recrutamento.**

Participaram dessa atividade pesquisadores, mestrandos, bolsistas e voluntários de iniciação científica, após treinamento do grupo.

Para a identificação e seleção dos possíveis sujeitos da pesquisa, utilizou-se das seguintes condutas (Figura 1).



**Figura 01.** Condutas para a abordagem dos usuários das salas de curativos e identificação dos possíveis sujeitos. Fonte: Sant`ana (2011).

Para a realização do recrutamento dos possíveis participantes, os pesquisadores permaneciam no corredor próximo a sala de curativos para observação e abordagem dos usuários.

Durante a abordagem, os pesquisadores se apresentavam e investigavam o motivo que os levaram a procurar atendimento na sala de curativos e observava-se a presença de curativos nos membros inferiores. Caso o paciente relatasse a presença de úlceras nos membros inferiores,

solicitava-se autorização para observação da realização do curativo, com a finalidade de verificação ao atendimento dos critérios de inclusão.

Após a observação, convidava-se os pacientes formalmente e os informava sobre a pesquisa. A seguir era oferecido a eles o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Apêndice A), quando se esclarecia de que poderia consentir assinando o termo naquele momento ou oportunamente, caso preferisse levar o termo consigo.

### **3.4 Procedimentos para a coleta de dados**

Após a assinatura do TCLE, para contemplação de todos os critérios de elegibilidade foram solicitados aos pacientes os exames prévios relacionados ao tratamento da lesão, foi consultado o prontuário e realizada avaliação clínica da úlcera.

No encontro subsequente realizou-se a avaliação clínica composta por entrevista e exame físico. Foram necessários dois encontros para a realização da coleta de todos os dados.

Para a obtenção dos dados dos participantes, utilizou-se um roteiro estruturado composto por dados sócio demográficos e características clínicas (Anexo A).

O instrumento utilizado foi desenvolvido por pesquisadores da Rede Goiana de Pesquisa em Avaliação e Tratamento de Feridas. Realizou-se o teste piloto com a aplicação dos protocolos de coleta de dados em pacientes com úlcera de perna em uma UBS com a finalidade de avaliar sua clareza,

operacionalidade e fidedignidade aos objetivos propostos, e se havia consenso dos avaliadores quanto à nomenclatura.

Após todos os procedimentos para avaliação clínica, as úlceras foram classificadas.

Em decorrência da falta de consenso sobre os critérios para classificação das úlceras venosas, no presente estudo foram adotados os seguintes:

**Critério 1 - Apresentar as condições I, II III – classificação = úlcera venosa**

Com base na literatura específica sobre úlceras venosas (MAKDISSE, 2004; FRADE et al., 2005; ABBADE & LASTÓRIA, 2006; BERGONSE & RIVITTI, 2006; GREY; ENOCH; HARDING, 2006; ETUFUGH & PHILLIPS, 2007; SIEGGREEN, 2005; CLOSS; NELSON; BRIGGS, 2008; MAFFEI et al., 2008; SILVA, 2008; DEALEY, 2008; CONUEI, 2009; RAFFETTO, 2009), elaborou-se o seguinte conjunto de indicadores denominado critério 1:

**I- índice tornozelo braço (ITB)  $\geq 0,9$  em membro acometido**

**II – presença de *uma ou mais* das seguintes *alterações clássicas para úlceras venosas***

**a) características predominantes das úlceras:**

- localização em região perimaleolar interna ou na região da zona 2
- bordas não circunscritas
- superficiais
- mais extensas
- leito com tecido de granulação predominantemente
- exsudativas, intensidade variadas

- b) telangectasias e/ou varizes
  - c) edema em tornozelo e/ou acima
  - c) alterações na pele quanto à:
    - pigmentação: cor acastanhada (ocre), purpúrica recente
    - inflamação: celulite e/ou eczema
    - turgor: lipodermatoesclerose
  - e) a dor melhora com elevação do membro inferior e piora com ortostatismo prolongado
  - f) diagnóstico médico mediante resultado de exame complementar de imagem indicativo de trombose venosa e/ou insuficiência venosa por obstrução e/ou refluxo dos sistemas venosos
- III-** Ausência de qualquer evidência de comprometimento de circulação arterial.

**Critério 2 - Apresentar as condições IV, V e VI – classificação = úlcera venosa** (EWMA, 2003; FRADE et al., 2005; ABBADE & LASTÓRIA, 2006; BERGONSE & RIVITTI, 2006; GREY; ENOCH; HARDING, 2006; ROBSON et al., 2006; ETUFUGH & PHILLIPS, 2007; SIEGGREEN, 2005; CLOSS; NELSON; BRIGGS, 2008; MAFFEI et al., 2008; SILVA, 2008; DEALEY, 2008; CONUEI, 2009; MILIC et. al., 2009; RAFFETTO, 2009)

- IV-** Apresentar ITB entre **0,75 e 0,9** em membro acometido;
- V-** apresentar **no mínimo três ou mais** características clássicas de úlcera venosa:
- localização em região perimaleolar interna ou na região da zona 2
  - bordas regulares
  - superficiais

- formato arredondado
- leito com tecido de granulação predominantemente
- exsudativas, intensidade variada

Além de ***pelo menos duas ou mais*** das seguintes:

- telangectasias e/ou varizes
- edema em tornozelo e/ou acima
- alterações na pigmentação da pele: eritema perilesão ou dermatite ocre;
- celulite e/ou eczema;
- lipodermatoesclerose
- dor que melhora com elevação do membro inferior e piora com ortostatismo prolongado
- registro médico no prontuário do sujeito, de hipótese diagnóstica de insuficiência venosa ou resultado de exame complementar de imagem indicativo de trombose venosa e/ou insuficiência venosa por obstrução e/ou refluxo dos sistemas venosos.

**VI** - Ausência de qualquer evidência de comprometimento de circulação arterial

**Critério 3 - Apresentar as condições VII, VIII, IX, X – classificação = úlcera venosa com moderada complicação arterial** (JORGE & DANTAS, 2003; CONUEI, 2009; EWMA, 2003; ROBSON et al., 2006; MAKDISSE et al., 2007; SIEGGREEN, 2005; MILIC et. al.,2009)



**VII-** Apresentar **ITB entre 0,5 e menor que 0,9** em membro acometido;

**VIII-** apresentar ***uma ou mais*** características clássicas de úlcera venosa:

- localização em região perimaleolar interna ou na região da zona 2
- bordas regulares
- superficiais
- formato arredondado
- leito com tecido de granulação predominantemente
- exsudativas, intensidade variada

Além de ***pelo menos uma ou mais*** das seguintes:

- telangectasias e/ou varizes
- edema em tornozelo e/ou acima
- alterações na pigmentação da pele: eritema perilesão ou dermatite ocre.
- celulite e/ou eczema
- lipodermatoesclerose
- registro médico no prontuário do sujeito, de hipótese diagnóstica de insuficiência venosa ou resultado de exame complementar de imagem indicativo de trombose venosa e/ou insuficiência venosa por obstrução e/ou refluxo dos sistemas venosos.

**IX-** apresentar ***no mínimo uma*** evidência clara de comprometimento de alteração da circulação arterial:

- claudicação intermitente

- dor que melhora quando o MI é colocado na posição pendente e piora quando o MI é elevado
- registro médico no prontuário do sujeito, de hipótese diagnóstica de insuficiência ou obstrução arterial ou resultado de exame complementar de imagem indicativo de trombose arterial e/ou insuficiência arterial.

**X-** apresentar ***duas ou mais*** evidências sugestivas de obstrução arterial periférica:

- pulsos arteriais diminuídos
- alterações tróficas, como: hipotricose, unhas espessadas e/ou irregulares, pele seca e /ou descamativa
- extremidade fria em relação ao membro não acometido ou área não comprometida

**Critério 4 - Apresentar as condições XI, XII e XIII– classificação = úlcera arterial** (EWMA, 2003; MOFFATT, et. al., 2004; CLOSS; NELSON; BRIGGS, 2008; SIEGGREEN, 2005; DEALEY 2008; CONUEI, 2009)

**XI-** Apresentar **ITB  $\leq$  0,75** em membro acometido

**XII-** presença de ***uma ou mais*** das seguintes alterações:

- a) claudicação intermitente
- b) dor que melhora quando o MI é colocado na posição pendente e piora quando o MI é elevado
- c) pulsos arteriais diminuídos

- d) alterações tróficas, como: hipotricose, unhas espessadas e/ou irregulares, pele seca e /ou descamativa
  - e) extremidade fria em relação ao membro não acometido ou área não comprometida
  - f) características predominantes das úlceras:
    - extremidades dos artelhos
    - região lateral do pé ou calcanhar
    - área decorrente de trauma
    - leito da lesão com tecidos pálidos ou com predominância de necrose
    - tecidos mais profundos acometidos (músculos, tendões, ossos)
    - bordas circunscritas
    - pouco exsudato
  - g) registro médico no prontuário do sujeito, de hipótese diagnóstica de insuficiência ou obstrução arterial ou resultado de exame complementar de imagem indicativo de trombose arterial e/ou insuficiência arterial.
- XIII-** Não apresentar qualquer evidência de alteração na circulação venosa

### **3.5 Identificação de sinais clínicos de infecção local na lesão e obtenção de espécime para análise microbiológica**

A ferida foi avaliada de acordo com os critérios da *European Wound Management Association* (EWMA 2005), sobre sinais e sintomas relacionados à infecção em úlceras venosas por meio de um roteiro (Anexo B) e, em seguida, foi colhida a amostra clínica para análise microbiológica.

Os sinais e sintomas listados para identificação de infecção foram os seguintes:

**Celulite:** foi observada a presença de infecção do tecido subcutâneo, com sinais flogísticos tais como: calor, dor, rubor e edema e bordas não delimitadas.

**Aumento da temperatura da pele perilesão:** verificou-se aumento da temperatura na pele adjacente a ferida, tendo como parâmetro uma amplitude de cerca de quatro centímetros da margem da ferida, comparada a distância de 10 centímetros da região da lesão. Avaliaram-se as diferenças na temperatura da pele utilizando o dorso da mão ou a região anterior do pulso do examinador, protegido por luva.

**Aumento da dor da úlcera /mudança na natureza da dor:** para esse sinal, tinha-se como parâmetro a verbalização do paciente quanto ao aumento da dor ao redor da lesão desde o início do desenvolvimento da úlcera. Solicitava-se ao paciente selecionar a alternativa mais apropriada para o nível de dor na ferida de acordo com as alternativas:

- 1) Eu não sou capaz de detectar a dor na área da ferida;
- 2) Estou com menos dor agora do que no início;
- 3) A intensidade da dor é a mesma desde que iniciou a úlcera;
- 4) A dor na ferida é maior agora do que quando iniciou.

**Formação de novas úlceras nas margens inflamadas da úlcera**

**pré-existente:** observou-se a presença de bordas hiperemiadas com características de inflamação e abaulamento, tipo bolsões, acompanhada de maceração.

**Ampliação da ferida nas margens inflamadas:**

buscaram-se sinais de inflamação como hiperemia, túnel em formação, edema e/ou abaulamento, presença de rompimento e aumentando na área de delimitação da ferida.

**Descoloração do tipo opaca ou tijolo vermelho escuro:**

verificou-se o leito da ferida quanto à presença de tecido de granulação pálido, descorado ou vermelho escuro.

**Tecido de granulação friável que sangra facilmente:**

avaliou-se o leito da ferida quanto à presença de tecido de granulação com sangramento fácil ao ser manipulado durante a limpeza ou utilização de *swab* no leito da ferida.

**Aumento da viscosidade do exsudato:**

observou-se a ocorrência de aumento da viscosidade do exsudato com questionamento ao paciente ou profissional de saúde sobre as características quanto ao espessamento e densidade do mesmo e observação direta pelo pesquisador.

**Aumento do volume do exsudato:**

verificou-se a ocorrência de aumento da quantidade do exsudato com questionamento ao paciente

ou profissional de saúde relacionado ao número de trocas de cobertura em 24 horas.

**Mau cheiro:** caracterizou-se como odor fétido, distintamente desagradável ou odor anormal sendo este discreto, moderado e intenso, verificado na sala de curativo antes e após a retirada da cobertura secundária.

**Nova manifestação de ferida de coloração amarronzada:** Verificado pelo aparecimento de tecido tipo necrótico de cor marrom.

**Aparecimento súbito ou aumento da quantidade de esfacelos:** Verificado por questionamento ao paciente e ao profissional, incluindo a observação da presença de esfacelo na borda ou no leito da ferida de coloração amarela ou esverdeada.

**Repentino aparecimento de manchas necróticas negras:** observada a presença de tecido necrótico de cor negra ou cinza.

**Aumento do tamanho da úlcera:** ampliação do tamanho da úlcera, verificada mediante relato do paciente e/ou profissional de saúde considerando por um período de duas semanas.

Os sinais ou sintomas adicionais presentes na lesão foram classificados em indicadores sendo estes - **forte, moderado e fraco** (EWMA, 2005) listados a seguir:

***Indicador forte de infecção:*** Celulite

**Indicador moderado de infecção:** Aumento de temperatura local da pele; aumento de dor na úlcera /mudança na natureza da dor; formação de novas úlceras nas margens inflamadas da úlcera pré-existente; ampliação da ferida nas margens inflamadas

**Indicador fraco de infecção:** descoloração do tipo opaca/ tijolo vermelho escuro; tecido de granulação friável que sangra facilmente; aumento da viscosidade do exsudato; aumento do volume do exsudato; mau cheiro; nova manifestação de ferida de coloração amarronzada; aparecimento súbito ou aumento da quantidade de esfacelos; repentino aparecimento de manchas necróticas negras; aumento do tamanho da úlcera.

Para a obtenção do espécime, realizou-se a limpeza da ferida utilizando-se de soro fisiológico 0,9% (Halex Istar<sup>®</sup>), em jato, perfurado com agulha (BD<sup>®</sup>) 40x12 e, quando necessário, fricção com gaze estéril para desbridamento da lesão.

Foram coletados espécimes de lesões que apresentavam diâmetro  $\geq 2 \text{ cm}^2$  com a finalidade de reduzir o risco de contaminação das amostras (AMBROSCH; LOBMANN; POTT; PREIBLER, 2008).

Para a coleta de espécime, realizou-se a técnica de Levine et al. (1976), na qual gira-se o *swab* durante 5 segundos em seu próprio eixo em um único ponto do leito da ferida e, a seguir, mergulha-se o mesmo no meio de transporte.

O material coletado das feridas foi inoculado em tubos com meio de transporte *Stuart* (COPAN®) e transportado para o laboratório por um período de até 12 horas.



**Figura 2-** Tubo contendo meio de transporte *Stuart* com haste para coleta de espécime.

Foram realizadas fotografias das lesões, e as imagens foram utilizadas para delimitação do tamanho da ferida, reavaliação macroscópica para definição de caso e confirmação dos sinais macroscópicos de infecção local.

### **3.6 Equipamentos utilizados para avaliação clínica**

Para a avaliação clínica, utilizou-se os seguintes equipamentos: aparelho Doppler vascular portátil (Medjet DV2001®), câmera fotográfica (Sony® Cyber-shot DSC-HX1, 9.1 megapixels), régua de 30 cm com escalas em cm e mm utilizadas nas fotografias, equipamento de proteção individual (capote, gorro, máscara, óculos protetor, luvas esterilizadas e de procedimento) de acordo com a Norma regulamentadora NR-32, que trata da segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde (MTE, 2005). Os equipamentos e instrumentos utilizados foram submetidos à limpeza e desinfecção com álcool a 70%, antes e após o uso.



### **3.7 Isolamento e identificação dos bastonetes Gram-negativos, realização dos testes de suscetibilidade dos micro-organismos aos antimicrobianos e detecção dos fenótipos de resistência**

As análises laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia Médica do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP) da Universidade Federal de Goiás (UFG), no período de outubro de 2009 a outubro de 2010, sendo utilizadas as técnicas recomendadas por Oplustil et al., (2004) e Koneman et al., (2008). Os procedimentos foram realizados pela doutoranda, sob supervisão direta de um microbiologista.

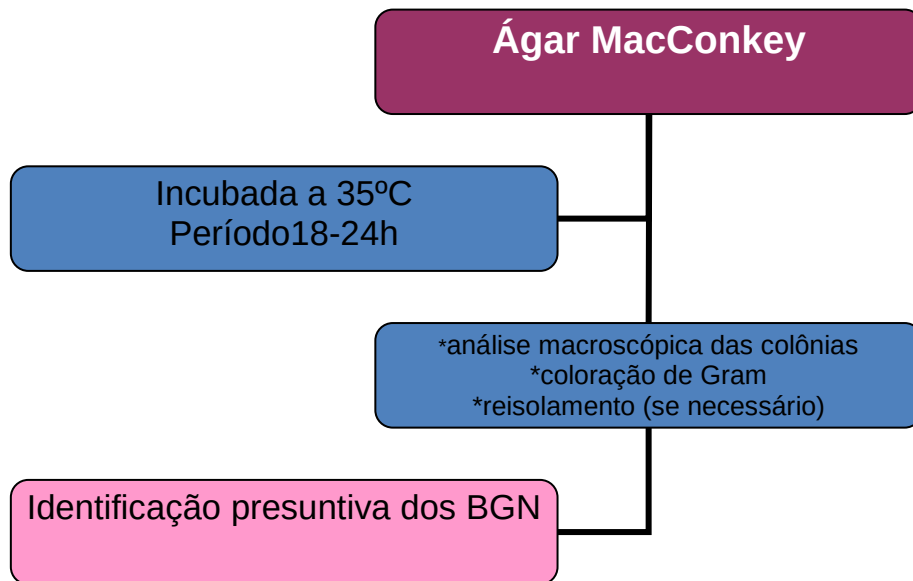
Em todos os testes realizados, foram empregadas cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) da *American Type Culture Collection*, como controle de qualidade.

#### **3.7.1 Isolamento primário e identificação presuntiva de bastonetes Gram-negativos fermentadores (enterobactérias) e não fermentadores (BGNNF)**

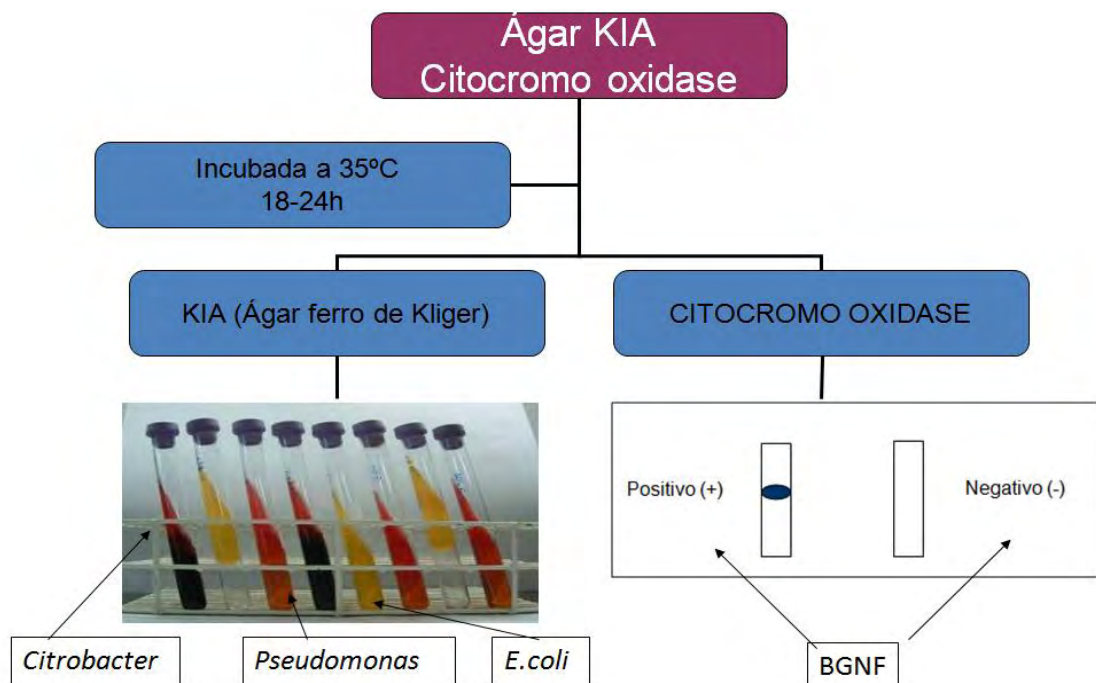
Para a realização do isolamento primário e identificação dos bastonetes gram-negativos foram utilizados testes de triagem e provas bioquímicas e enzimáticas padronizadas (OPLUSTIL et al., 2004; KONEMAN et al., 2008) de acordo com os fluxogramas a seguir:

As descrições dos procedimentos encontram-se em anexo (ANEXO C):

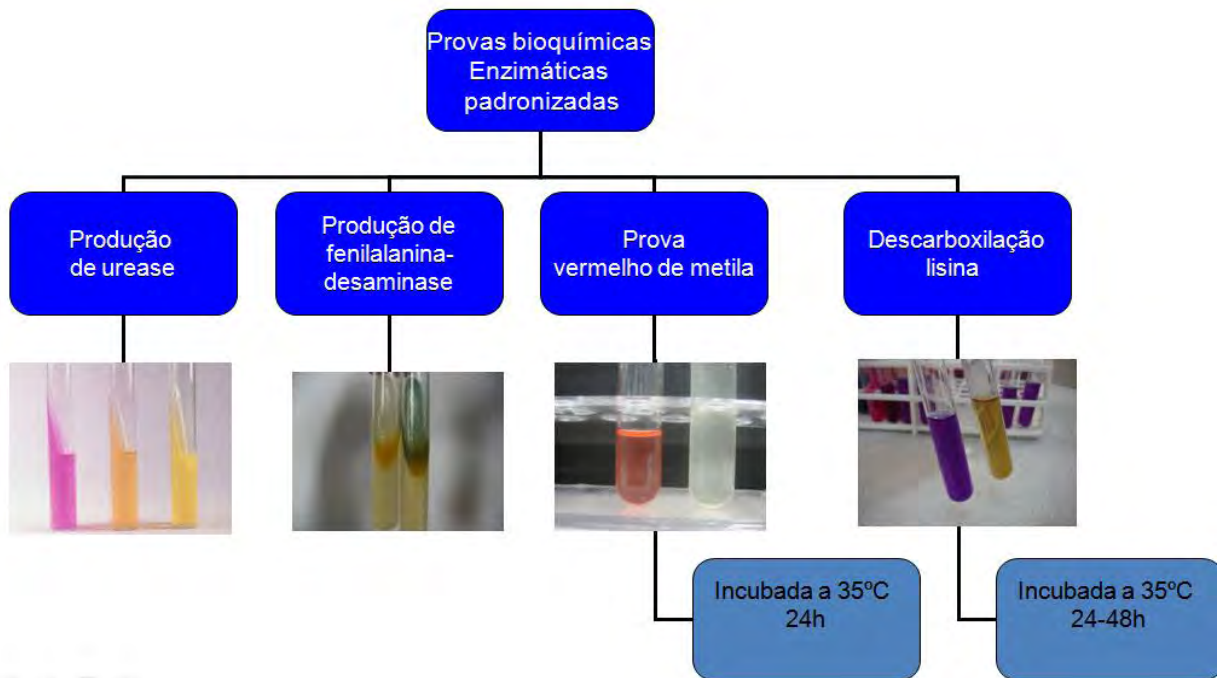
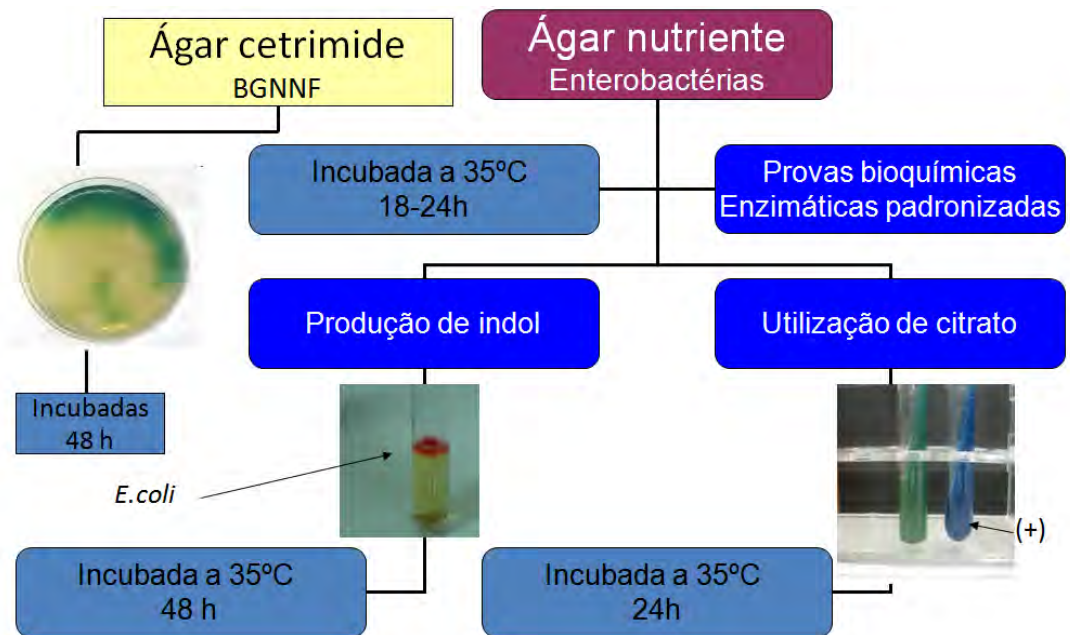
- **Isolamento primário de BGN (Enterobactérias e BGNNF)**



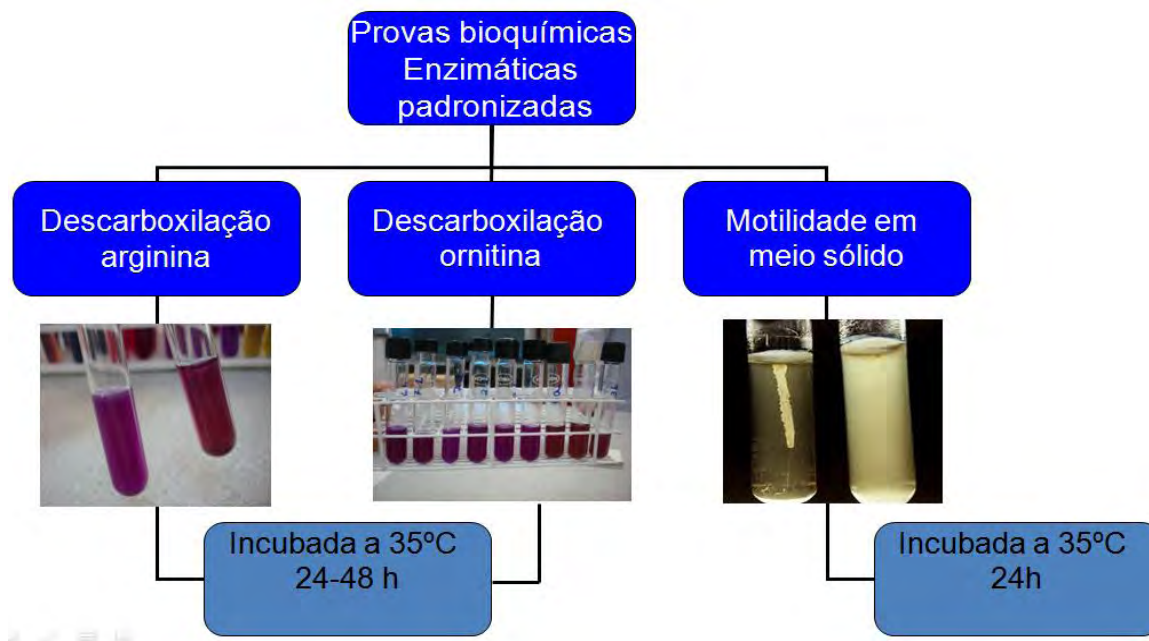
- **Teste de triagem para BGN (Enterobactérias e BGNNF)**



- **Identificação dos bastonetes Gram-negativos fermentadores (Enterobactérias)**



As provas de urease, fenilalanina-desaminase e vermelho de metila foram incubadas a 35° por 24 horas.



### 3.7.2 Identificação de bastonetes Gram-negativos não fermentadores (BGNNF)

Para a identificação dos gêneros e espécies do grupo BGNNF, foram realizadas as seguintes provas (ANEXO C):

- **Produção de pigmento em ágar centrímide** – O ágar cetrimide (Himedia®.) é um meio sólido, seletivo e diferencial para *Pseudomonas aeruginosa*. Esse meio é empregado para a detecção da produção de pigmentos característicos, como fluoresceína (verde) e piocianina (azul), por espécies de *P. aeruginosa*. Para isso, as colônias bacterianas foram cultivadas e incubadas a 35°C por até 48h. As colônias características podem apresentar-se azul, verde azuladas ou não-pigmentadas.

As provas descarboxilação da lisina, arginina e ornitina, produção de indol, produção da uréase, motilidade também foram realizadas e se

encontram descritas no item identificação de bastonetes Gram-negativos fermentadores (enterobactérias).

### **3.7.3 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão (antibiograma)**

Os isolados, uma vez identificados, foram avaliados quanto à sua suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton (Himedia®). Cepas padrão da *American Type Culture Collection* (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) foram utilizadas como controle de qualidade para os testes realizados.

A escolha dos discos de antimicrobianos se deu em decorrência do perfil dos micro-organismos enterobactérias ou BGNNF e do sítio anatômico investigado, as úlceras venosas (MARTINS, 2008). Os antimicrobianos avaliados são utilizados na prática clínica e estão preconizados pela literatura (MACHADO et al., 2003; DIAMENT & LOMAR, 2005; HERNANDEZ, 2006; KONEMAN et al., 2008) e foram aprovados pelo *United States Food and Drug Administration* (US-FDA) para testes de sensibilidade e relatórios de rotina, sobre organismos não fastidiosos, segundo a *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009).

Para a realização do antibiograma, o micro-organismo em estudo foi cultivado em ágar nutriente (Himedia®), incubado por 24 h, e após esse período, um inóculo bacteriano foi preparado por suspensão direta. Três ou mais colônias isoladas foram inoculadas em 4 mL de solução salina estéril,

de acordo com a turbidez da escala padrão 0,5 de MacFarland (NCCLS, 2003).

Em seguida, com o auxílio de um swab (COPAN<sup>®</sup>) estéril o inóculo bacteriano ajustado à escala padrão foi semeado em toda a superfície do ágar Mueller-Hinton, em movimentos de zig-zag, de forma a assegurar uma semeadura uniforme e crescimento confluyente (NCCLS, 2003).

A aplicação dos discos de papel de filtro contendo os antimicrobianos na superfície do ágar Mueller-Hinton foi realizada individualmente com pinça esterilizada, pressionando-se os mesmos contra o meio. Os discos foram distribuídos com espaçamento de 3cm entre eles e de 2cm da borda da placa (Apêndice B) . As placas foram incubadas a uma temperatura de 35°C por 24 h.

A leitura dos halos de inibição do crescimento bacteriano foram reportados como sensível, intermediário ou resistente (Anexo D), conforme recomendações da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009).

Para as enterobactérias, foram utilizados os antimicrobianos: amoxicilina/acido clavulânico (20/10µg), aztreonam (20/10µg), cefepima (30µg), cefotaxima (30µg), cefoxitina (30µg), cefpodoxima (10µg), ceftazidima (30µg), ceftriaxona (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), levofloxacina (5µg), meropenem (10µg), tetraciclina (30µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg), trimetropim/sulfametoxazol (1.25/23.75µg) (MACHADO et al. 2003; DIAMENT & LOMAR, 2005; HERNANDEZ, 2006; LOPES, 2005).

Para os BGNNF: amicacina (30µg), aztreonam (30µg), cefepima (30µg), cefotaxima (30µg), cefoxitina (30µg), ceftazidima (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), levofloxacina (5µg), meropenem (10µg), polimixina B (300 U), piperacilina/ tazobactam (100/10µg), trimetropim/ sulfametoxazol (1.25/23.75µg) (MACHADO et al. 2003; DIAMENT & LOMAR, 2005; HERNANDEZ, 2006; LOPES, 2005).

### **3.7.4 Detecção de fenótipos de resistência entre os bastonetes Gram-negativos**

#### **3.7.4.1 Produção de beta-lactamases por bastonetes Gram-negativos fermentadores (enterobactérias)**

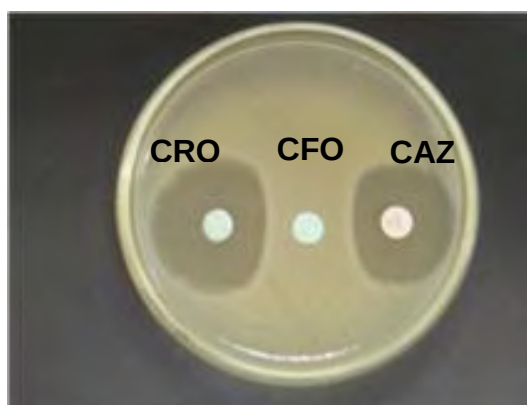
##### ***Produção de beta-lactamase tipo AmpC***

Foram submetidos ao teste os micro-organismos do grupo CESP, *M.morganii* e *P. aeruginosa*, os quais apresentaram sensibilidade a cefoxitina no Teste de Sensibilidade antibiograma por Disco-Difusão, uma vez que esse perfil pode caracterizar a produção da enzima AmpC em pequena quantidade (OPLUSTIL et al., 2004; ROSSI & ANDREAZZI, 2005). A leitura do teste se baseou na presença de sensibilidade à cefoxitina (diâmetro do halo  $\geq 18$  mm) (CLSI, 2009).

Foram utilizados para o teste confirmatório, os antimicrobianos ceftriaxona e ceftazidima colocadas a uma distância de 20mm da cefoxitina centro a centro (Figura 13). A cefoxitina foi utilizada como um indutor da enzima AmpC. O teste foi realizado sob as mesmas condições técnicas recomendadas para o Teste de Sensibilidade Antimicrobiana por Disco-

Difusão (CLSI, 2009), sendo realizado por disco-aproximação ou *double-disc synergism* (OPLUSTIL et al., 2004).

A leitura foi reportada sendo positiva quando houve a formação de um achatamento do halo da ceftriaxona ou ceftazidima ou de ambos (Figura 10).



**Figura 3:** Teste confirmatório do fenótipo de resistência beta-lactamase tipo AmpC. Resultado positivo - achatamento dos halos dos antimicrobianos ceftriaxona e ceftazidima.

#### ***Produção de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL)***

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009; CLSI, 2011) padroniza a metodologia de detecção de cepas produtoras de ESBL somente para *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Proteus mirabilis*. A detecção de ESBL em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae* ainda não está padronizada. Dessa forma, todos os isolados que foram identificados bioquimicamente como pertencentes a uma dessas espécies bacterianas foram submetidos ao teste de produção de ESBL.

Na rotina diária, faz-se necessária a implementação de duas etapas: teste de *screening* (triagem) e o teste confirmatório. Ambos os testes são

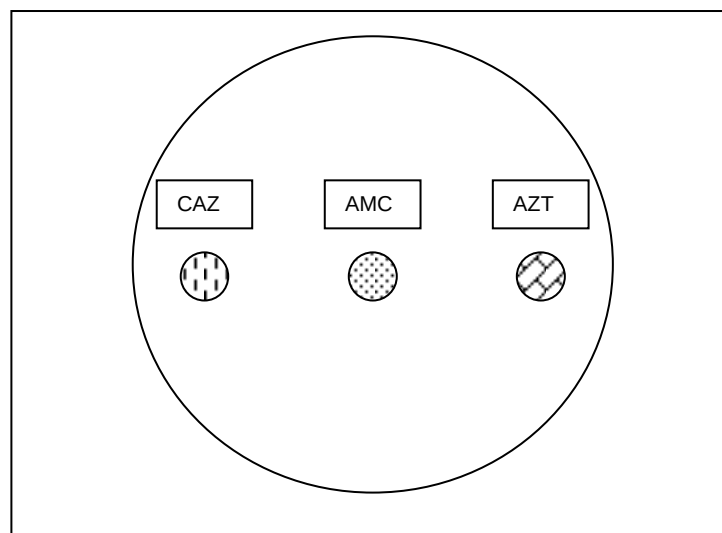


realizados sob as mesmas condições técnicas recomendadas para o Teste de Sensibilidade Antimicrobiana por Disco-Difusão (CLSI, 2009).

O teste de *screening* é um método de triagem para o fenótipo de ESBL. Com a finalidade de aumentar a sensibilidade do teste foram, empregados cinco substratos (discos de antimicrobianos), os quais funcionam como marcadores do fenótipo ESBL: aztreonam 30µg, cefotaxima 30µg, cefpodoxima 10µg, ceftazidima 30µg e ceftriaxona 30µg, com a finalidade de aumentar a sensibilidade do teste (CLSI, 2009).

A leitura do teste se baseia na medida do diâmetro dos halos obtidos no antibiograma. Suspeita-se de cepa produtora de ESBL quando são encontradas zonas com os seguintes diâmetros:  $\leq 27$  mm para aztreonam, ou  $\leq 27$  mm para cefotaxima, ou  $\leq 17$  mm para cefpodoxima, ou  $\leq 22$  mm para ceftazidima ou  $\leq 25$  mm para ceftriaxona (CLSI, 2009).

O teste confirmatório (disco-aproximação) é realizado colocando um disco de amoxicilina-ácido clavulânico a uma distância de 2 cm (centro a centro e lateralmente) de um disco de ceftazidima e aztreonam. O aumento ou distorção da zona ao redor do disco de amoxicilina-ácido clavulânico (zona fantasma) indica a presença da enzima ESBL (Figura 11) (JALIER et al., 1988; GANGOUÉ et al., 2005; HE´LE`NE GARREC et al., 2011).



**Figura 4** – Disposição dos discos de ceftazidima (CAZ); amoxicilina+ácido clavulânico (AMC) e Aztreonam (AZT) para a realização do teste confirmatório da produção de ESBL.

#### **3.7.4.2) Produção de beta-lactamases por bastonetes Gram-negativos Não-fermentadores (BGNNF)**

##### ***Produção de beta-lactamase tipo AmpC***

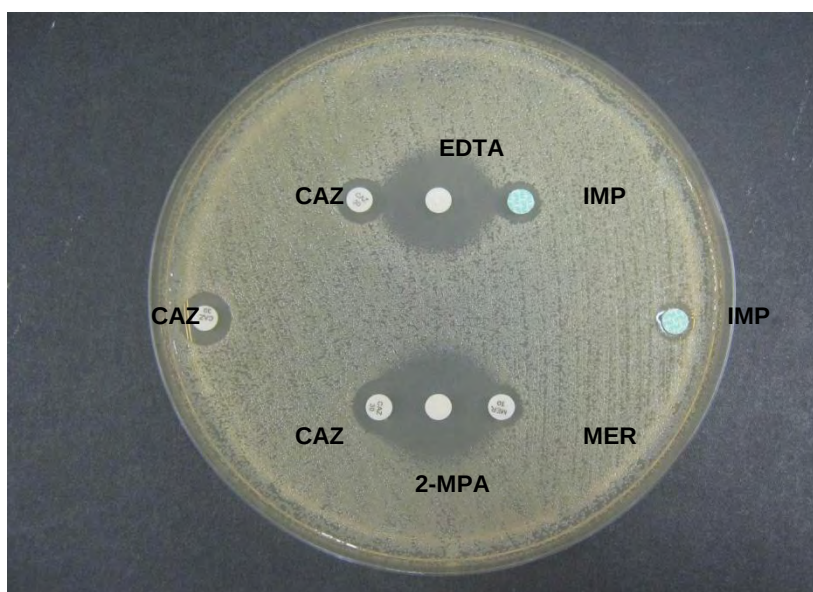
A realização do teste de produção de beta-lactamase tipo AmpC para os BGNNF ocorreu da mesma maneira como descrito anteriormente para as enterobactérias do grupo CESP.

##### ***Produção de metalo-beta-lactamase (MBL)***

As amostras de *P. aeruginosa* que apresentaram sensibilidade reduzida ao imipenem (halo  $\leq 13$ mm), meropenem (halo  $\leq 13$ mm) e ceftazidima (halo  $\leq 14$ mm) e sensíveis ao aztreonam (halo  $\geq 22$ mm) foram submetidas ao teste fenotípico para MBL, pelo método do disco aproximação descrito por Arakawa et al., (2000).

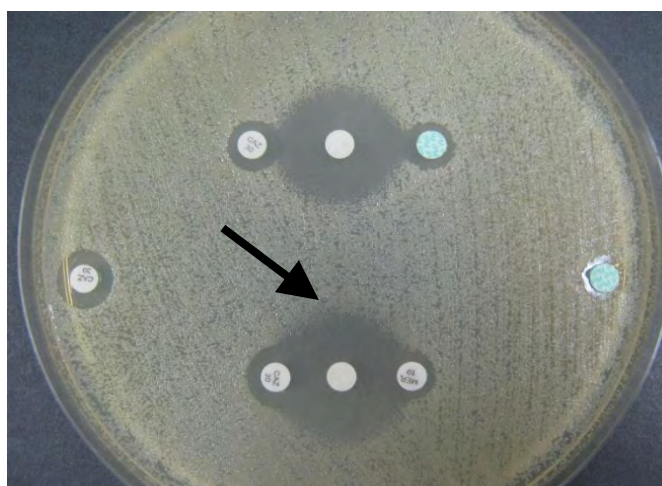
Utilizou-se o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) e o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Os substratos para a realização do teste foram discos de ceftazidima (30 $\mu$ g) e imipenem (10 $\mu$ g) posicionados ao lado de um disco de papel de filtro esterilizado *Blank disc* equidistantes a 25mm.

Para a realização do teste, foi preparada uma suspensão bacteriana, com turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland de cada amostra de *P. aeruginosa* e semeada em placa de ágar Mueller-Hinton (Himedia<sup>®</sup>). Foi adicionado sobre cada disco em branco de papel de filtro (*blank disc*, Oxoid<sup>®</sup>), posicionados a uma distância de 25mm (centro a centro), uma alíquota de 3  $\mu$ L de solução contendo 1,2 g/mL de 2-MPA. Foram colocados mais dois discos de papel de filtro a uma distância de 5mm dos substratos (ceftazidima e imipenem) onde foram adicionadas alíquotas de 5  $\mu$ L de EDTA (0,5M) em cada papel de filtro, com o objetivo de verificar se haveria inibição do crescimento bacteriano devido à presença do composto acrescentado (Figura 12). As placas foram incubadas por 18 a 24 horas à temperatura de 35°C (ARAKAWA et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 2009).



**Figura 5** - Distribuição dos discos para a realização do teste fenotípico para a detecção de metalo-beta-lactamase

A presença de uma zona de expansão ou distorção no halo de inibição do crescimento entre os discos contendo o 2MPA ou EDTA e os discos de ceftazidima e imipenem foram indicativos de que o isolado é possivelmente produtor de uma metalo-beta-lactamase (Figura 13).



**Figura 6** - Zona de expansão ou distorção no halo de inibição do crescimento entre os discos contendo o 2MPA ou EDTA

#### 3.7.4.3 Armazenamento

Após o isolamento, identificação bioquímica/enzimática das espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade, o micro-organismo em estudo foi cultivado em agar nutriente e incubado a 35°C. Após 24 horas de incubação, as colônias bacterianas foram transferidas com o auxílio de um *swab* para quatro tubos tipo *epenforff* contendo caldo *tripitic soy* (TSB) (Himedia® )

acrescido de 20% de glicerol. Posteriormente, os *epenforffs* foram armazenados a – 20°C e a – 80° C (OPLUSTIL et al., 2004)

### 3.8. Variáveis do estudo

#### ***As variáveis sócio demográficas estudadas foram:***

- **Idade:** definida pela data de nascimento indicada em documento de identificação;
- **Gênero:** masculino ou feminino, definido a partir da observação de caracteres sexuais secundários, observados pelos pesquisadores;

#### ***As variáveis clínicas incluídas foram:***

- **Tempo de duração da lesão:** informado pelo sujeito da pesquisa em anos e caracterizada em meses;
- **Dor no leito da lesão:** informado pelo paciente;
- **Hiperemia da pele perilesional:** presença de área avermelhada em torno da lesão num perímetro de até 10 cm;
- **Hipertermia da pele perilesional:** aumento da temperatura local comparando-se com a região proximal;
- **Borda edemaciada:** presença de edema por inflamação caracterizada por dor, calor e rubor;
- **Borda hiperemiada:** presença de vermelhidão nas bordas;

- **Hipertermia da borda:** presença de calor nas bordas;
- **Borda dolorosa:** informada pelo paciente ao realizar a manipulação da ferida durante o curativo;
- **Exsudato purulento:** presença de exsudato purulento, piossanguinolento e purulento–esverdeado;
- **Celulite:** inflamação da derme e/ou do tecido subcutâneo;
- **Aumento de temperatura local na pele:** temperatura elevada detectável na pele adjacente da ferida, cerca de 4cm da margem da ferida quando comparado a 10 cm da região da lesão;
- **Aumento de dor na úlcera /mudança na natureza da dor:** informada pelo paciente mediante se houve aumento da dor ao redor da lesão desde o desenvolvimento da úlcera.
- **Formação de novas úlceras nas margens inflamadas da úlcera pré-existente:** observou-se a presença de bordas hiperemiadas com características de inflamação e abaulamento, tipo bolsões, acompanhada de maceração.
- **Ampliação da ferida nas margens inflamadas:** buscou-se sinais de inflamação como hiperemia, túnel em formação, edema e/ou abaulamento, presença de rompimento, aumentando a área de delimitação da ferida.
- **Descoloração do tipo opaca/ tijolo vermelho escuro:** presença de tecido de granulação pálido, descolorado.

- **Tecido de granulação friável que sangra facilmente:** tecido de granulação que sangra facilmente ao ser manipulado.
- **Infecção:** presença de pelo menos uma das variáveis clínicas de acordo com a EWMA (2005).

#### ***Variáveis microbiológicas***

- **Cultura positiva/negativa:** crescimento de colônias bacterianas após o período de incubação de 24 horas, em ágar MacConkey ou não.
- **Presença de enterobactérias:** presença de isolados de espécies da família Enterobacteriaceae como: *E. coli*, *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *M. morganii*, *Providencia rettgeri*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *Enterobacter* spp..
- **Presença de BGNNF e outros:** *Pseudomonas* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*.
- **Fenótipo de resistência para  $\beta$  lactamases:** bastonetes Gram-negativos com resultados positivos para AmpC, ESBL e Metallo- $\beta$ -lactamase.

### **3.9 Análise estatística**

O banco de dados foi estruturado no *software Statistic Package for Social Sciences® for Windows* – SPSS (versão 17.0). Os dados foram

inseridos no banco por dois pesquisadores, foi realizada a análise de consistência dos mesmos.

Em seguida realizou-se procedimentos de estatística descritiva (frequências absolutas e relativas, medidas de tendência central) e inferencial (análise de proporções, teste Qui-quadrado) adotando-se  $p < 0,05$ , utilizando os *Software* SPSS e Epiinfo® (versão 6).

### **3.10 Aspectos Ético-Legais**

Atendendo a Resolução número 196/96 (MS, 1996) sobre pesquisa envolvendo seres humanos, o projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás para apreciação e parecer ético, protocolo (041/2009) (Anexo E). Os dados foram coletados mediante aquiescência dos gestores da Secretaria Municipal de Saúde, Diretoria da Rede Básica, Gestores Técnicos de cada Unidade Básica de Saúde inseridas no estudo, e dos sujeitos, por meio do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice A).



## 4 PUBLICAÇÕES

---

**Artigo 1 – Antimicrobial susceptibility and the production of  $\beta$ -lactamases in isolated gram-negative bacteria of venous ulcers in primary health care patients**

**Autores:** Silvana de Lima Vieira dos SANTOS, Maria Márcia BACHION e colaboradores

**Revista:** *The Brazilian Journal Infection Disease* (Submetido)

**Artigo 2 – Avaliação clínica de úlceras venosas: presença de sinais e sintomas de infecção e resultado de cultura para bastonetes Gram-negativos**

**Autores:** Silvana de Lima Vieira dos SANTOS, Maria Márcia BACHION e colaboradores

**Revista:** *Acta Paulista de Enfermagem*

## Artigo1

### Antimicrobial susceptibility and the production of $\beta$ -lactamases in isolated gram-negative bacteria of venous ulcers in primary health care patients

**Abstract:** This cross-sectional study was performed in the dressing rooms of primary healthcare centers in Goiânia, Goiás, Brazil, with the following objectives: to identify the prevalence of gram-negative bacteria in venous ulcers with clinical signs of infection; analyze the susceptibility profile of the isolates; and detect the production of AmpC  $\beta$ -lactamases and metallo-beta-lactamases and ESBL. The participants were 69 patients with venous ulcers, with or without arterial complication, totaling 98 lesions. It was verified that 74.5% of the lesions showed GNB (gram-negative bacteria) growth, particularly enterobacteria (53.8%) and non-fermenting gram-negative bacteria (46.2%). The prevalent species among the enterobacteria was *Escherichia coli* (24.5%), followed by *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans* and *Proteus mirabilis* (12.2% each). Regarding the non-fermenting gram-negative bacteria (NFGNB), the prevalent genus was *Pseudomonas* (66.6%), particularly the species *P. aeruginosa* (59.5%), present in 25.5% of the analyzed wounds. Regarding the susceptibility profile of the enterobacteria, the highest resistance rates were to tetracycline (38.8%) and amoxicillin-clavulanic acid (26.5%). Among *P. aeruginosa*, the highest resistance was observed for ceftazidime (100%). Regarding the production of the AmpC enzyme, 30% of the microorganisms in the CESP (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. and *Providencia* spp.) group. The remaining microorganisms of the CESP group (70%) that were sensitive to ceftazidime were subjected to a confirmatory test, and 37.5% were found to be positive for the production of the AmpC enzyme. Regarding metallo-beta-lactamase (MBL), 23.8% of the NFGNB showed reduced sensitivity to imipenem, meropenem or ceftazidime. When subjected to the confirmatory test, 8% of the *P. aeruginosa* were positive for the MBL enzyme.

**Keywords:** Gram-negative bacteria; beta-lactamases; venous ulcer

## INTRODUCTION

Infections are among the factors that hinder the healing process of vascular ulcers [1,2,3]. Infection is a frequent process [4,5,6,7,8], considering that the lesions are exposed to the environment for a long period of time, besides the poor health conditions of the hosts [6,7]. The lack of solutions for healing these lesions has serious effects on the quality of life of these individuals [1,2,3].

Among the microorganisms present in the infectious processes of venous ulcers, it is common to find gram-positive microorganisms, namely *Staphylococcus aureus* [9,10] and gram-negative bacteria (GNB), particularly *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis* [5, 10,11,12,13].

The scientific community has become more concerned about GNB over the last several years because of their profile of resistance to antimicrobial medications, thus increasing the difficulty in establishing an effective treatment [14,15,16,17] .

The main resistance mechanism of the GNB is the production of beta-lactamases, particularly the AmpC and the metallo-beta-lactamases (MBL) [18].

The AmpC beta-lactamases hydrolyse penicillins, cephalosporins and monobactams, are not inhibited by beta-lactamase inhibitors and contain a chromosomal origin for some microorganisms. The CESP group, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Morganella morganii*, are examples of gram-negative bacteria that induce chromosomal AmpC enzymes [19].

When exposed to inducing agents, these microorganisms, particularly penicillins, cephalosporins and carbapenems, are stimulated to produce large amounts of AmpC  $\beta$ -lactamases. When the inducing agent is withdrawn, the enzyme production is reduced to basal levels [20,21].

These bacteria that present with innate AmpC production commonly begin to show sensitivity in the antibiogram, thus causing an inadequate conduct to be established. When treatment is implemented, this same microorganism can show resistance, which compromises the treatment and affects the quality of the care [20,21].

In other cases, spontaneous mutation occurs, in which there may be permanent production of AmpC due to the loss of the genetic repressor usually present in this group of bacteria. These mutant strains show resistance in the antibiogram [21].

The metallo-beta-lactamase (MBL) produced by several GNB, particularly *P. aeruginosa*, has a great clinical and epidemiological importance because it affects several broad-spectrum  $\beta$ -lactams, including the carbapenems. Detecting MBL-producing microorganisms is of great importance in controlling wound infections and implementing effective treatments [22,23].

In the management of vascular ulcers, particularly venous ulcers, it is recommended that a microbiological analysis be performed when there are clinical signs of infection, before the implementation of any antimicrobial therapy [4,6,10,24].

Although the microorganisms most often present in the lesions are known, they can vary according to geographic areas and with time, hence the importance of monitoring the distribution of the different types of strains [25].

The scarcity of epidemiological data regarding the infectious agents and their resistance mechanisms hinders the formulation and adoption of appropriate policies to control healthcare-associated infections (HCAIs) in the field of wound evaluation and treatment in primary healthcare. Therefore, it is necessary to be aware of the presence of gram-negative bacteria in these lesions.

The objectives of the present study were to identify the prevalence of gram-negative bacteria in venous ulcers with clinical signs of infection; analyze the susceptibility profile of the isolates; and detect the production of AmpC  $\beta$ -lactamases and metallo-beta-lactamases.

## **MATERIAL AND METHODS**

This cross-sectional study was performed in each of the 49 dressing rooms of the primary health care network of Goiânia (Goiás, Brazil), where patients with chronic wounds are evaluated and treated. The participants were patients under going treatment for venous ulcers, between October of 2009 and October of 2010. Within this period of time, a total of 130 patients were receiving treatment for leg ulcers in the referred dressing rooms. The research team was able to include 111 participants; the others did not regularly attend the healthcare services. Thirteen patients declined to participate. Of the remaining 98 patients, 87 met the inclusion criteria: have a venous ulcer with or without arterial complication; age  $\geq 18$  years; and present at least one of the signs of infection according to the description of

the European Wound Management Association [24]. Eighteen patients withdrew from the study and did not complete the data collection process. Therefore, the study sample was comprised of 69 participants.

### ***Procedures for data collection***

Data collection was performed using an interview script addressing the sociodemographic data of the individuals and the clinical characteristics of the lesions. The presence of clinical signs and symptoms of infection was evaluated according to the protocol described by the European Wound Management Association [24].

The specimens were collected following the technique described by Levine et al. (1976) [26], which presents outcomes similar to those found using the biopsy technique [10].

The specimens were inoculated in a transport media (Stuart) and forwarded to the laboratory at room temperature within 12 hours.

### ***Microbiological analysis and susceptibility profile***

For the primary isolation of the gram-negative bacteria, the samples were plated on MacConkey agar and incubated for 24 hours at 35°C. Next, the GNB were identified by means of standardized biochemical tests and subjected to susceptibility testing to antimicrobial medication using the disk-diffusion technique, following a standardized technique [27]. Standard strains (*Escherichia coli* ATCC®25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC®27853) were used as quality controls in the tests [28].

The antimicrobial medications used in the resistance profile study were selected based on the current literature [29,30,31,32].

The following antimicrobials were used in the resistance profile for the enterobacteria: amoxicillin/ clavulanic acid (20/10µg), aztreonam (20/10µg), cefepime (30µg), cefotaxime (30µg), cefoxitin (30µg), cefpodoxime (10µg), ceftazidime (30µg), ceftriaxone (30µg), ciprofloxacin (5µg), gentamicin (10µg), imipenem (10µg), levofloxacin (5µg), meropenem (10µg), tetracycline (30µg), piperacillin/tazobactam (100/10µg), and trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75µg).

The antibiotics used in the resistance profile for the non-fermenting gram-negative bacteria (NFGNB): amikacin (30µg), aztreonam (30µg), cefepime (30µg), cefotaxime (30µg), cefoxitin (30µg), ceftazidime (30µg), ciprofloxacin (5µg), gentamicin (10µg), imipenem (10µg), levofloxacin (5µg), meropenem (10µg), polymyxin B (300U), piperacillin/ tazobactam (100/10µg) and trimethoprim/ sulfamethoxazole (1.25/23.75µg).

### ***Phenotypic detection of AmpC β-lactamases***

The microorganisms identified as belonging to the CESP group, *P. aeruginosa* and *M. morganii*, were evaluated in terms of the production of AmpC β-lactamases using the cefoxitin disk test as the phenotypic marker [29]. The isolates sensitive to cefoxitin on the antibiogram were subjected to a complementary confirmatory test, using disk approximation [19].

A bacterial suspension corresponding to the 0.5 McFarland standard was prepared and plated on the surface of Mueller-Hinton agar. One ceftriaxone and one ceftazidime disk were placed 20mm apart (center-to-center) on the cefoxitin disk. The cefoxitin was used as an inducing agent for the AmpC enzyme.

The plates were incubated for 18 to 24 hours at 35°C. The result was considered positive when a flattened halo was observed around the ceftriaxone or ceftazidime, or both (Figure 1).

### ***Phenotypic detection of metallo-beta-lactamase***

The production of metallo-beta-lactamase by GNB was evaluated using the imipenem, meropenem and ceftazidime disks as phenotypic markers. The isolates that presented reduced sensitivity to one of these antimicrobials and to aztreonam were subjected to the confirmatory test [23,33].

Ceftazidime (30µg) and imipenem (10µg) disks were placed 25mm apart (center-to-center) on a filter paper disk (*blank disc* Oxoid®) containing 3µL of 2-mercaptopropionic acid (1.2 g/mL 2-MPA) and another soaked with 5µL of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Figure 2). Ceftazidime (30µg) and imipenem (10µg) disks were also used separately as controls. The plates were incubated for 18 to 24 hours at 35°C [33].

The appearance of an inhibition halo or any increase in the size of the halo around the ceftazidime and/or imipenem disks and the meropenem were considered to be indications of the production of metallo-beta-lactamase (Figure 2).

### ***Ethical-legal aspects***

The research was approved by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Goiás (protocol 041/2009).



### **Data analysis**

The data were analyzed by means of descriptive statistics procedures (absolute and relative frequencies, mode and median), using the Statistical Package for the Social Sciences for Windows – SPSS® (version 17.0).

### **RESULTS**

Evaluations were performed on 69 patients, who had between one and five lesions, with a mode of one lesion and median of two lesions, totaling 98 ulcers. Most participants were male (58%), aged between 28 and 93 years, with a median of 62 years. The duration time of the lesions was between two months and 66 years, with a median of 27 months (2.25 years) and a mode of 60 months (5 years).

Regarding the microbiologic analysis, it was verified that in 74.5% of the lesions there was GNB growth, with a total of 91 isolated GNB. The identified bacteria belonged to the *Enterobacteriaceae* family (53.8%) and the NFGNB group (46.2%) (Table 1).

Among the enterobacteria, the prevalent bacterium was *Escherichia coli* (24.5%), followed by *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans* and *Proteus mirabilis* (12.2% each). In addition, *Klebsiella pneumoniae* was also identified in two lesions (4.1%) from different patients treated in different health centers. Regarding the NFGNB, the most prevalent genera was *Pseudomonas* (66.6%), particularly the species *P. aeruginosa* (59.5%), present in 25.5% of the analyzed wounds (Table1).

Regarding the susceptibility profile of the enterobacteria, the highest resistance rates were to tetracycline (38.8%), amoxicillin-clavulanic acid (26.5%), and sulfamethoxazole-trimethoprim (24.5%). The enterobacteria

were 100% sensitive to eight of the tested antimicrobials, including the beta-lactam: aztreonam, cefepime, cefotaxime, cefpodoxime, ceftazidime, ceftriaxone, imipenem and meropenem. The quinolones were also active against most of these isolates (Table2).

The NFGNB showed sensitivity to several antimicrobials, including beta-lactams such as amikacin, meropenem, ceftazidime and cefepime. Among the *P. aeruginosa*, the highest resistance was observed for cefoxitin (100%) and sulfamethoxazole-trimethoprim (80%). The other species of *Pseudomonas* and the other NFGNB showed a similar susceptibility profile (Table3).

Regarding the production of the AmpC enzyme, 30% of the microorganisms of the CESP group and 100% of the *P. aeruginosa* were resistant to cefoxitin on the antibiogram, thus verifying the presence of mutant strains, i.e., strains that have lost the regulator mechanism and produce AmpC continuously. The other microorganisms of the CESP group (70%) that were sensitive to cefoxitin were subjected to the confirmatory test and 37.5% tested positive, which verified the production of inducible AmpC.

Regarding the detection of metallo-beta-lactamase, 23.8% of the NFGNB presented reduced sensitivity to imipenem, meropenem or ceftazidime. When subjected to the confirmatory test, it was observed that 8% of the *P. aeruginosa* tested positive.

## DISCUSSION

In this study, the GNB identified in the venous ulcers are commonly present in chronic skin lesions [5,8,10,11,12,13]. The prevalence of GNB (74.5%) in the lesions evaluated in this study is superior to the findings

reported in literature, which report ranges between 47% and 60% for venous ulcers [10,34].

These microorganisms are not part of the normal skin microbiota and many are from the human intestinal tract. *E.coli*, for instance, indicates fecal contamination [20,35]. This fact has severe clinical implications for the patients, as many of these microorganisms are known to be virulent and can predispose to limb amputations [12] and systemic infections, in extreme situations and depending on the immunological status of the patient [20].

Regarding the species isolated in the present study, it was verified that the results agree with the literature, because studies regarding the infecting agents of venous ulcers identified the presence of enterobacteria in 40% of lesions [36] and *P. aeruginosa* in 60% [10]. The identification of *P. aeruginosa* has important clinical relevance because it is invasive and toxigenic [20]. Regarding the ulcers, there should be heightened awareness of this bacterium's ability to form a biofilm [37], which has a significant effect on the healing process and on the efficacy of the treatment. *Pseudomonas aeruginosa* can lead to the development of severe infections in individuals, including sepsis [16,38,39].

Another relevant issue is the identification of *K. pneumoniae*, which does not belong within the normal skin microbiota. This bacterium can be isolated from other human sites and also environmental sources, such as hospitals. It has several virulence factors, including the production of beta-lactamases and also the capacity to form biofilms [20,40,41,42]. Despite being identified as a colonizer of chronic wounds, *Klebsiella* has a low isolation frequency in the studies addressing these lesions [4,11,43].

Regarding the susceptibility profile, enterobacteria presented high sensitivity rates to most of the tested antimicrobials, including those recommended [19,44] for the treatment of severe infections caused by these agents, such as carbapenems, quinolones and cefepime.

Although the enterobacteria presented low resistance rates to tetracycline and amoxicillin-clavulanic acid, this fact should be highlighted because they refer to broad-spectrum antimicrobials [30,33]. Amoxicillin-clavulanic acid has been recommended as the first choice for treating infections with *E. coli* as the etiologic agent [32]. This drug has an associated beta-lactamases inhibitor that hinders the resistance mechanism of microorganisms mediated by the production of beta-lactamases [21,30]. Resistance to this antimicrobial is evidence of the presence of other resistance mechanisms[31].

Among the microorganisms of the CESP group, 37.5% of the isolates were characterized as being producers of inducible AmpC beta-lactamase. This is very relevant data from the clinical perspective, due to the possibility of treatment failure when using second- and third-generation penicillins and cephalosporins. Bacteria that produce inducible AmpC can be sensitive to the drugs described *in vitro* (listed in the antibiogram) and show resistance during the treatment [19].

The NFGNB isolated in this study were also sensitive to many antimicrobials. However, all the *P. aeruginosas* were resistant to ceftazidime, thus characterizing hyperproduction of the AmpC enzyme by mutant strains. It is important to highlight that mutant strains can be selected from inducible populations during treatment with agents that are weak inducers [19].

Despite the low percentage regarding the production of metallo-beta-lactamases (8%), this data should be highlighted. The studied population is within an outpatient setting and, generally, this resistance phenotype is identified in isolates of nosocomial infections in highly complex units [22,45].

The metallo-beta-lactamase enzyme affects all the beta-lactams, except the monobactams, assigning high resistance levels to the carbapenems. These are broad-spectrum antimicrobials indicated for the treatment of skin and soft tissue infections caused by multi-drug resistant microorganisms [31,45].

Although this study did not identify the presence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemases in the isolated *K. pneumoniae*, healthcare professionals who care for this population should be cautious regarding the possibility of their appearance. Carbapenemase-producing *Klebsiella* spp. make therapy with beta-lactam antimicrobials impossible because they inactivate them all, including the carbapenems [46].

A study regarding the frequency of antimicrobial resistance in Latin America found that 31.4% of the ESBL-producing bacteria were acquired in the community, with *K. pneumoniae* among the identified microorganisms [42].

Healthcare professionals should be concerned about knowing the profile of the microorganisms isolated in healthcare institutions, because the antibiogram is an *in vitro* laboratory test that evaluates the response pattern of the bacteria based on pre-established concentrations of antimicrobials. The reported sensitivity results suggest that the evaluated drug can be used

*in vivo* to eliminate the pathogen; however, these data should not be considered to be exact[32].

The antibiogram does not consider clinical aspects that affect the infectious process, such as: age, infection site, renal function, and the patient's health condition/presence of disease. The results should be interpreted considering the type of microorganism, its pathogenicity and resistance mechanism(s) [5,32,47]. The wounds generally present polymicrobial infections [8] and the antibiogram for each species should be analyzed considering all of the microorganisms present to support making the appropriate choice of treatment.

One study [48] suggests that laboratories should release the antibiogram reports calling attention to the fact that strains initially sensitive to certain antibiotics can be producers of inducible AmpC beta-lactamases.

In order to detect multi-drug resistant strains, studies [22,42] also suggest that the microbiological analysis services should perform confirmatory and phenotypic screening tests [49] to more precisely detect the resistance mechanisms with clinical and epidemiological relevance.

The detection of microorganisms in venous ulcers and their profile of resistance to the antimicrobials used in practice could help in choosing the best therapy to be used by the team [50]. However, what is observed is that there are few studies in the literature that address patients undergoing treatment through primary healthcare services. This makes it difficult to understand the pattern of the isolated microorganisms in this type of patient, as well as making healthcare decisions.

According to a technical report of the Brazilian National Health Surveillance Agency published in 2010, one recommendation in regards to identifying multi-drug resistant microorganisms is to notify infection control services, in addition to several other significant measures [46] such as: *“contact precautions added to the standard precautions for every healthcare professional, visitor, and companions; strengthening the institutional policy regarding the rational use of antimicrobials; encouraging hand washing; assessing the need to implement cohort measures regarding healthcare professionals and patients; assessing the need to implement the practice of collecting surveillance cultures according to the epidemiological profile of the institution; emphasizing general environmental hygiene measures; applying, in addition to the standard precaution measures, contact precautions during intra- and inter-institution transportation, regarding the healthcare professionals who maintain direct contact with the patients, including the reinforcement of environmental hygiene measures; and communicating, in the case of intra- and inter-institution transfers, if the patient is infected or colonized by multi-drug resistant microorganisms”.*

The Brazilian recommendations [46] for preventing the dissemination of multi-drug resistant microorganisms are aimed at health facilities in general, including primary healthcare centers. These centers should consult with their own infection control center, as well as enlisting the support from the Municipal Commissions for Infection Control in Healthcare Services. This could contribute to generating data that could help in the implementation of timely local infection control measures.

It is still unclear how to manage primary healthcare patients with venous ulcers who have multi-drug resistant microorganisms, hence the need to discuss the public policies concerning this issue, considering that protection, prevention and control measures are not exclusively restricted to the healthcare professionals providing outpatient care to this population.

The identification of strains with resistance profiles can be an indication of the dissemination across health care units, because a large number of the study subjects were undergoing special treatment at highly specialized units that were reference centers for the treatment of venous ulcers. One way to confirm the dissemination of inter-institutional clones would be to perform genotypic tests.

## **CONCLUSION**

The presence of gram-negative pathogens with resistance profiles in primary healthcare patients suggests the need to implement microbiological surveillance for patients with venous ulcers experiencing a prolonged or difficult healing process.

## **Acknowledgements**

The authors thank *Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Goiás* – FAPEG.

## **References**

1. Ferreira MC, Tuma Júnior P, Carvalho VF, et al. Complex wounds. *Clinics*. 2006;61(6):571-8.



2. Herber OR, Schnepf W, Rieger MA. A systematic review on the impact of leg ulceration on patients' quality of life. *Health Qual Life Outcomes*. 2007;5:44
3. Macêdo EAB, Oliveira AKA, Melo GSM, et al. Characterization socio-demographic of patients with venous ulcers treated at a university hospital. *Rev enferm UFPE on line* [Internet] 2010;4(spe):1863-7. Available from: <http://www.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/view/1475>.
4. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):244-69.
5. Bowler PG. The 10(5) bacterial growth guideline: reassessing its clinical relevance in wound healing. *Ostomy Wound Manage*. 2003;49(1):44-53.
6. White RJ, Cutting KF. Critical colonization--the concept under scrutiny. *Ostomy Wound Manage*. 2006;52(11):50-6.
7. Davies CE, Hill KE, Newcombe RG, et al. A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs. *Wound Repair Regen*. 2007;15(1):17-22.
8. Martins MA, Tipple AFV, Reis C, et al. Úlcera crônica de perna de pacientes em tratamento ambulatorial: análise microbiológica e de suscetibilidade antimicrobiana. *Ciênc. cuid. saúde*. 2010;9(3):464-70.
9. Gomes FSL, Carvalho DV, Lima EDRP. Tratamento de feridas crônicas com coberturas oclusivas. *Reme: Rev. Min. Enferm*. 2009;13(1):19-27.
10. Cooper RA, Ameen H, Prince P, et al. A clinical investigation into the microbiological status of 'locally infected' leg ulcers. *Int Wound J*. 2009;6(6):453-62.

11. Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, et al. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(2):143-9.
12. Santos VP, Silveira DR, Caffaro RA. Risk factors for primary major amputation in diabetic patients. *São Paulo Med J.* 2006;124(2):66-70.
13. Quege GH. Estudo comparativo do uso de um produto à base de ácidos graxos essenciais (AGE) e de uma biomembrana de látex no tratamento de feridas crônicas infectadas em pacientes curados de hanseníase [dissertation] Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem; 2008. 235p.
14. Salgado FXC, Oliveira SLT, Silva NB, et al. Avaliação da prevalência de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em uma unidade de terapia intensiva. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(Suppl 1):86.
15. Melo GB, Barbaresco LF, Gontijo Filho PP. Fatores de risco e evolução de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Pseudomonas aeruginosa* em uma unidade de terapia intensiva (UTI): um estudo prospectivo. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(Suppl 1):97.
16. Ferreira ML, Dantas RCC, Moreira APA, et al. Incidência de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases em hospital universitário: distribuição endêmica e epidêmica. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(Suppl 1):102.
17. Moreira MR, Rocha LA, Guimarães MP, et al. Uso de antimicrobianos, etiologia e perfil de resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) responsáveis por pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVs) em unidade de terapia intensiva

de um hospital universitário brasileiro. Braz J Infect Dis. 2011;15(Suppl 1):171.

18. Tavares W. Manual de Antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. São Paulo: Atheneu; 2002.

19. Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005.

20. Winn Junior WC, Koneman EW, Allen SD, et al. Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

21. Sader HS. Resistência bacteriana a antimicrobianos. In: Focaccia R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 89-107.

22. Torres JCN, Menezes EA, Ângelo MRF, et al. Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. J Bras Patol Med Lab. 2006; 42(5):313-9.

23. Figueiredo DQ, Castro LFS, Santos KRN, et al. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. J Bras Patol Med Lab. 2009;45(3):177-84.

24. European Wound Management Association. Identifying criteria for wound infection [Internet]. London: MEP Ltd; 2005 [cited 2012 feb 14]. Available from:

[http://ewma.org/fileadmin/user\\_upload/EWMA/pdf/Position\\_Documents/2005\\_Wound\\_Infection\\_English\\_pos\\_doc\\_final.pdf](http://ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA/pdf/Position_Documents/2005_Wound_Infection_English_pos_doc_final.pdf).

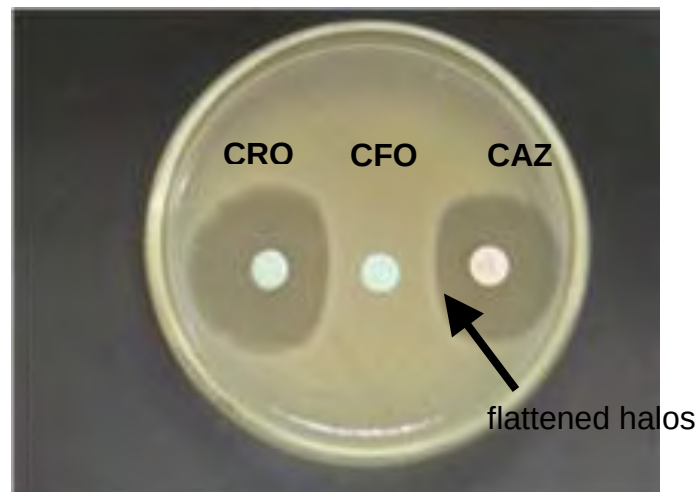
25. Medjía C, Zurita J, Guzmán-Blanco M. Epidemiologia e vigilância de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina na América Latina. Braz J Infect Dis. 2009;14(Suppl 2):79-86.

26. Levine NS, Lindberg RB, Mason AD Jr, et al. The quantitative swab culture and smear: a quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. *J Trauma*. 1976;16(2):89-94.
27. NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. Pennsylvania: NCCLS; 2003.
28. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS document M100-S19 Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
29. Barros E, Bittencourt H, Caramori ML, et al. Antimicrobianos: consulta rápida. Porto Alegre: Artmed; 2003
30. Diamant D, Lomar AV. Guia prático de antibióticos e antibioticoterapia. In: Focaccia R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 47-87.
31. Hernandez R. The use of systemic antibiotics in the treatment of chronic wounds. *Dermatol Ther*. 2006;19(6):326-37.
32. Lopes HV, Antibióticos e antibióticoterapia. In: Focaccia R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 31-45.
33. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al. Convenient Test for Screening Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):40-3.
34. Wolcott RD, Gontcharova V, Sun Y, et al. Evaluation of the bacterial diversity among and within individual venous leg ulcers using bacterial tag-encoded FLX and Titanium amplicon pyrosequencing and metagenomic approaches. *BMC Microbiol*. 2009; 9:226.

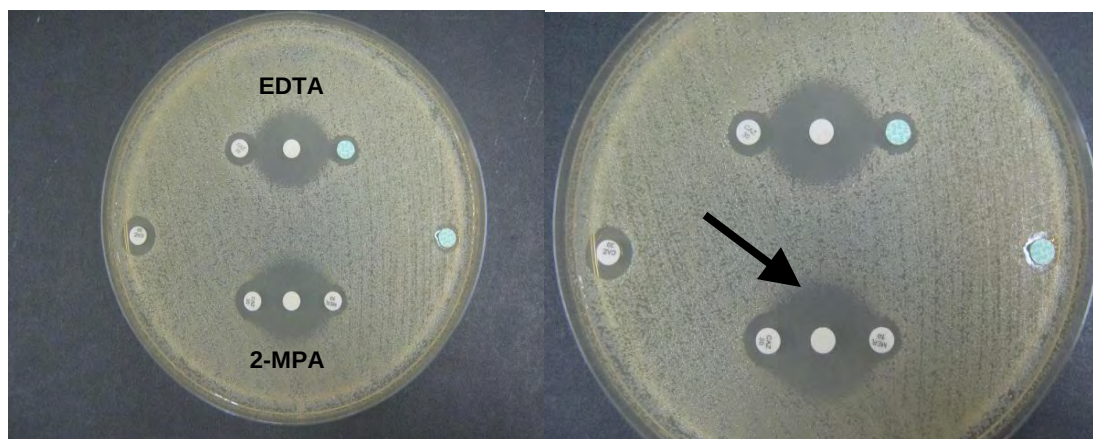
35. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, et al. Jawetz, Melnick e Adelberg. Microbiologia Médica. 24th edição. Porto Alegre: McGraw-Hill, 2008.
36. Ambrosch A, Lobmann R, Pott A, et al. Interleukin-6 concentrations in wound fluids rather than serological markers are useful in assessing bacterial triggers of ulcer inflammation. *Int Wound J*. 2008;5(1):99-106.
37. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, et al. Microbiologia de Brock. 12th edição. Porto Alegre: Artmed, 2010.
38. Levin ASS, Arruda EAG, Oliveira MS. Infecções por *Pseudomonas*. In: Focaccia R. Tratado de Infectologia. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 971-81.
39. Segheto L, Araújo ALA. Morbimortalidade associada à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes internados na UTI de um hospital universitário. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(Supl 1):107.
40. Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CMM. Identificação Laboratorial de  $\beta$  - Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) Revisão. *Rev bras anal clin*. 2006;38(3):171-7
41. Dienstmann R, Picoli SU, Meyer G, et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(1):23-7.
42. Villegas MV, Blanco MG, Sifuenes-Osornio J, et al. Increasing prevalence of extended-spectrum-betalactamase among Gram-negative bacilli in Latin America - 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Braz J Infect Dis*. 2011;15(1):34-9.

43. Martins MA. Avaliação de feridas crônicas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde de Goiânia [dissertation]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem; 2008. 143p.
44. Lima ALLM, Oliveira PRD. Recomendações para o manejo das infecções em úlceras neuropáticas das extremidades inferiores. São Paulo: Bevilacqua; 2011.
45. Magalhães V, Lins AK, Magalhães M. Metallo-b-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. Braz J Microbiol. 2005;36(2):123-5.
46. Agência Nacional de Vigilância a Saúde. Nota Técnica nº 1/2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasília (Brasil): ANVISA; 2010.
47. Dow G. Bacterial swabs and the chronic wound: when, how, and what do they mean? Ostomy Wound Manage. 2003;49(5A Suppl):8-13.
48. Mortari AP, Saucedo EM, Pereira RS, et al. Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de  $\beta$ -lactamases do tipo AMP-C em isolados clínicos de Santa Maria – RS. Rev bras anal clin. 2008;40(2):147-9.
49. Cury AP, Carmo DB, Maffucci M, et al. Valor preditivo negativo do Teste de Hodge Modificado na exclusão de enterobactérias produtoras de KPC. Braz J Infect Dis. 2011;15(Suppl 1):7.
50. Pinto IC, Passeri IAG, Silva DS, et al. (Re)organizando a sala de curativo do Centro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Acta paul enferm. 2005;18(1):89-93.

## FIGURES



**Figure 1.** Confirmation test for phenotype resistance to AmpC beta-lactamase. Positive result – flattened halos surrounding ceftriaxone and ceftazidime .



**Figure 2.** Phenotypic test to detect metallo-beta-lactamase. **Positive result:** an expansion or distortion zone in the halo of growth inhibition between the disks containing 2MPA or EDTA.

## TABLES

**Table 1.** Distribution of the gram-negative bacteria (n=91) identified in venous ulcers of patients treated in dressing rooms of Primary Health Centers in Goiânia, Goiás, Brazil

| Microorganisms                                       | n  | %    |
|------------------------------------------------------|----|------|
| <b>Non-fermenting Gram-negative bacteria (NFGNB)</b> | 42 | 46.2 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                        | 25 | 59.5 |
| <i>Pseudomonas sp.</i>                               | 03 | 7.1  |
| Other NFGNB                                          | 14 | 33.4 |
| <b>Enterobacteriaceae</b>                            | 49 | 53.8 |
| <i>Citrobacter freundii</i>                          | 02 | 4.1  |
| <i>Citrobacter sp.</i>                               | 01 | 2    |
| <i>Enterobacter aerogenes</i>                        | 06 | 12.2 |
| <i>Enterobacter gergoviae</i>                        | 01 | 2    |
| <i>Escherichia coli</i>                              | 12 | 24.5 |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>                            | 04 | 8.2  |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i>                         | 02 | 4.1  |
| <i>Morganella morganii</i>                           | 02 | 4.1  |
| <i>Pantoea agglomerans</i>                           | 06 | 12.2 |
| <i>Proteus mirabilis</i>                             | 06 | 12.2 |
| <i>Proteus vulgaris</i>                              | 04 | 8.2  |
| <i>Providencia rettgeri</i>                          | 03 | 6.2  |



**Table 2.** Susceptibility profile of Enterobacteria (n=49) isolated from the venous ulcers of patients treated in dressing rooms of the Primary Health Centers in Goiânia, Goiás, Brazil

| ANTIBIMICROBIALS              | R * |      | S* |       | I* |     |
|-------------------------------|-----|------|----|-------|----|-----|
|                               | n   | %    | n  | %     | n  | %   |
| Amoxicillin/clavulanic acid   | 13  | 26.5 | 34 | 69.4  | 02 | 4.1 |
| Aztreonam                     | -   | -    | 49 | 100.0 | -  | -   |
| Cefepime                      | -   | -    | 49 | 100.0 | -  | -   |
| Cefotaxime                    | -   | -    | 49 | 100.0 | -  | -   |
| Cefoxitin                     | 07  | 14.3 | 42 | 85.7  | -  | -   |
| Cefpodoxime                   | -   | -    | 49 | 100.0 | -  | -   |
| Ceftazidime                   | -   | -    | 49 | 100.0 | -  | -   |
| Ceftriaxone                   | -   | -    | 49 | 100.0 | -  | -   |
| Ciprofloxacin                 | 06  | 12.2 | 43 | 87.7  | -  | -   |
| Gentamicin                    | 03  | 6.1  | 46 | 93.8  | -  | -   |
| Imipenem                      | -   | -    | 49 | 100.0 | -  | -   |
| Levofloxacin                  | 06  | 12.2 | 42 | 85.7  | 01 | 2.0 |
| Meropenem                     | -   | -    | 49 | 100.0 | -  | -   |
| Piperacillin/tazobactam       | -   | -    | 48 | 97.9  | 01 | 2.0 |
| Tetracycline                  | 19  | 38.8 | 28 | 57.1  | 02 | 4.1 |
| Trimethoprim-sulfamethoxazole | 12  | 24.5 | 34 | 69.4  | 03 | 6.1 |

\*R – resistant, S – sensitive, I– intermediate

**Table 3.** Distribution of the susceptibility profile of the non-fermenting gram-negative bacteria (n=42) isolated from the venous ulcers of patients treated in the dressing rooms of Primary Health Centers in Goiânia, Goiás, Brazil

| Antimicrobials                | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (f=25) |    |    | <i>Pseudomonas</i> sp. (f=3) |     |    | BGN NF (f=14) |      |      |
|-------------------------------|--------------------------------------|----|----|------------------------------|-----|----|---------------|------|------|
|                               | R*                                   | S* | I* | R*                           | S*  | I* | R*            | S*   | I*   |
|                               | %                                    | %  | %  | %                            | %   | %  | %             | %    | %    |
| Amikacin                      | 16                                   | 80 | 04 | -                            | 100 | -  | -             | 100  | -    |
| Aztreonam                     | 12                                   | 88 | -  | -                            | 100 | -  | 7.1           | 78.7 | 14.2 |
| Cefepime                      | 12                                   | 88 | -  | -                            | 100 | -  | -             | 100  | -    |
| Cefoxitin                     | 100                                  | -  | -  | 100                          | -   | -  | 50            | 50   | -    |
| Cefotaxime                    | 20                                   | 44 | 36 | -                            | 33  | 67 | -             | 100  | -    |
| Ceftazidime                   | 12                                   | 84 | 04 | -                            | 100 | -  | -             | 100  | -    |
| Ciprofloxacin                 | 16                                   | 80 | 04 | 33                           | 67  | -  | 14.0          | 86.0 | -    |
| Gentamicin                    | 04                                   | 92 | 04 | -                            | 100 | -  | 7.1           | 92.8 | -    |
| Imipenem                      | 12                                   | 88 | -  | -                            | 100 | -  | 7.1           | 92.9 | -    |
| Levofloxacin                  | 28                                   | 72 | -  | 33                           | 67  | -  | 7.1           | 85.8 | 7.1  |
| Meropenem                     | 12                                   | 84 | 04 | -                            | 100 | -  | -             | 100  | -    |
| Piperacillin/tazobactam       | 12                                   | 88 | -  | -                            | 100 | -  | -             | 100  | -    |
| Polymyxin B                   | -                                    | 96 | 04 | -                            | 100 | -  | 7.1           | 92.9 | -    |
| Trimethoprim/sulfamethoxazole | 80                                   | 16 | 04 | 100                          | -   | -  | 35.7          | 64.3 | -    |

## Artigo 2

### **Avaliação clínica de úlceras venosas: presença de sinais e sintomas de infecção e resultado de cultura para bastonetes Gram-negativos**

#### **Resumo**

**Objetivos:** Descrever os sinais e sintomas clínicos de infecção em úlceras venosas (UV); avaliar o estágio clínico de infecção das lesões e a relação destes com a presença de bastonetes Gram-negativos (BGN). **Método:** Estudo transversal, amostra 69 pacientes, atendidos em unidades básicas de saúde em Goiânia, GO, no período de 10/2009 a 10/2010 que apresentavam lesões com indícios de infecção. Realizou-se avaliação microbiológica de todas as lesões. Utilizou-se de análise descritiva, teste de proporções e Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Destacaram-se, com frequência  $>70\%$ : descoloração do tipo opaca e/ou tijolo vermelho escuro; aumento do volume do exsudato e dor. O estágio três de infecção foi o mais prevalente (71,4%). Houve relação entre celulite e tecido de granulação friável que sangra facilmente e o resultado de cultura para BGN. **Conclusão:** A identificação de infecção nas UV deve ser norteadada pelo conhecimento acerca da etiologia, características clássicas e estágios clínicos de infecção.

**Descritores:** úlcera venosa, infecção, bactéria Gram-negativa, enfermagem

**Clinical evaluation of venous ulcers: the presence of signs and symptoms of infection and the culture results for Gram-negative bacteria**

#### **Abstract**

**Objectives:** To describe the clinical signs and symptoms of infection in venous ulcers (VU); assess the clinical stage of infection of the lesions and their relation with the presence of Gram-negative bacteria (GNB). **Method:** This cross-sectional study was performed with a sample of 69 patients of health care centers in Goiânia, Goiás, between October/2009 and

October/2010, who had lesions suggesting infection. All lesions were subjected to microbiological evaluation. Descriptive analysis, proportions and Chi-Square test ( $p < 0.05$ ) were used. **Results:** The highlighted results with  $>70\%$  frequency are: opaque and/or reddish brown discoloration; increase in exudate volume and pain. Stage-three infection was the most prevalent (71.4%). An relation was found between cellulitis and friable granulation tissue that bleeds easily and the culture for GNB. **Conclusion:** The identification of VU should be guided by knowledge regarding etiology, classic characteristics and the clinical stages of infection.

**Keywords:** venous ulcer, infection, gram-negative bacteria, nursing

### **Evaluación clínica de úlceras venosas: presencia de señales y síntomas de infección y resultado de cultivo para bacilos Gram-negativos**

#### **Resumen**

**Objetivos:** describir las señales y síntomas de infección en úlceras varicosas (UV); evaluar el estadio clínico de infección de lesiones y su relación con la presencia de bacilos Gram-negativos (BGN). **Método:** Estudio transversal, muestra 69 pacientes atendidos en unidades básicas de salud en Goiânia-GO, de 10/2009 a 10/2010 que presentaban lesiones con indicios de infección. Se efectuó evaluación microbiológica de todas las lesiones, utilizándose análisis descriptivo, test de proporciones y Qui-cuadrado ( $p < 0,05$ ). **Resultados:** Se destacaron, con frecuencia  $>70\%$ : decoloración de tipo opaca y/o ladrillo rojo oscuro; aumento del volumen de exudado y dolor. El estadio tres de infección fue el de mayor prevalencia (71,4%). Existió relación entre celulitis y tejido de granulación quebradizo que sangra fácilmente y el resultado de cultivo para BGN. **Conclusión:** La identificación en las UV debe ser orientada por el conocimiento etiológico, características clásicas y estados clínicos de infección.

**Descriptores:** úlcera varicosa, infección, bacilo Gram-negativo, enfermería

## INTRODUÇÃO

As úlceras venosas são geralmente colonizadas por micro-organismos, tanto residentes como transitórios da pele, e algumas vezes por agentes patogênicos<sup>(1-2)</sup>. Dentre os agentes patogênicos destacam-se bastonetes Gram-negativos (BGN), os quais são carreados até a ferida por meio de água contaminada ou contaminação cruzada em ambientes hospitalares<sup>(3-5)</sup>. Alguns são invasivos e toxigênicos e apresentam a capacidade de formar biofilme, o que interfere no tratamento instituído, seja sistêmico ou tópico. Devido a estas características, estes bastonetes têm levado pacientes a septicemias e ao óbito<sup>(5)</sup>.

Os BGN têm preocupado a comunidade científica nos últimos anos, devido a suas mudanças no perfil de resistência aos antimicrobianos, o que interfere na resolutividade do tratamento clínico<sup>(5-6)</sup>. Além disso, apresentam uma notável capacidade de formação de biofilme que se destaca<sup>(7)</sup>, interferindo na terapêutica.

A presença de BGN pode ser frequente em ambientes não hospitalares<sup>(8)</sup>, porém é pouco citado pela literatura. Estudos<sup>(6,9)</sup> tem reportado a presença e prejuízos causados por estes, em sua maioria em ambientes hospitalares.

A avaliação clínica dos sinais e sintomas de infecção nas úlceras e do quadro geral dos pacientes tem sido a base para a decisão quanto a instituição de terapêutica tópica com propriedades antimicrobianas e anti-sépticas, além de antibioticoterapia. Esta avaliação clínica leva em conta sinais e sintomas clássicos de infecção, tais como: dor, edema, rubor, calor e exsudato purulento<sup>(10)</sup>, bem como sinais adicionais descritos na literatura<sup>(2)</sup>. A análise de evidências clínicas de processo infeccioso deve considerar também a análise microbiológica<sup>(11-12)</sup>. Para efeitos práticos a EWMA<sup>(13)</sup>, padronizou a classificação de estágios clínicos de infecção em úlceras venosas, recomendando que a lesão seja monitorada, pois nos estágios um e dois, mesmo com a presença de sinais e sintomas clínicos de infecção, não há a necessidade de tratamento sistêmico. Já para os estágios três (pús, edema, dor, calor local e ainda celulite, linfangite ou gangrena) e quatro (sinais locais de infecção, pirexia, elevação de células brancas e sepsi), o uso de antimicrobiano sistêmico se faz necessário.

Para a instituição de terapêutica eficaz é necessário que a equipe seja interdisciplinar para que se consiga a resolutividade dos problemas dos pacientes com úlceras venosas. A equipe deve ser composta por Enfermeiro, Nutricionista, Médico e Fisioterapeuta, de maneira que seja garantida a qualidade da assistência<sup>(14)</sup>. O enfermeiro tem um papel singular neste processo<sup>(15)</sup>, pois dispõe de maior contato com estes indivíduos, sendo capaz de identificar precocemente tanto sinais e sintomas de infecção como evidências de que a terapêutica não está apresentando o efeito desejado.

Geralmente a assistência prestada aos pacientes com úlceras venosas tem sido realizada na atenção primária, pela equipe de enfermagem. Assim estudar a ocorrência dos sinais e sintomas clínicos de infecção, a distribuição dos estágios de infecção e a associação entre sinais e sintomas clínicos de infecção nas úlceras venosas e a presença de bastonetes Gram-negativos, pode contribuir para o desenvolvimento do conhecimento da Enfermagem na clínica dos processos infecciosos. Maior subsídio do profissional nesta área poderá contribuir para melhores decisões terapêuticas na escolha de produtos para uma assistência de qualidade.

O estudo teve como objetivos: descrever sinais e sintomas clínicos de infecção em úlceras venosas de pessoas em tratamento na atenção primária; avaliar o estágio clínico de infecção das lesões e avaliar a relação entre a presença do sinal ou sintoma clínico de infecção e a presença de bastonetes Gram-negativos.

## **MÉTODO**

Estudo transversal, realizado com pacientes em atendimento, para tratamento de úlceras venosas, em salas de curativos em unidades básicas de saúde no município de Goiânia, GO, de outubro/2009 a outubro/2010.

Foram estabelecidos como critérios de inclusão: ter úlcera venosa com ou sem complicação arterial; idade  $\geq 18$  anos; e apresentar um dos sinais ou sintomas clássicos de infecção ou sinais ou sintomas adicionais descritos pela *European Wound Management Association (EWMA)*<sup>(2)</sup>, exceto “cicatrização sem evolução apesar de adequada compressão”, uma vez que no cenário da pesquisa não há fornecimento regular de produtos para terapia compressiva.

Foram identificados 130 pacientes em tratamento para úlcera de perna nas salas curativo nesse período. Os pesquisadores conseguiram abordar 111 pacientes, entre os que mais que apresentavam assiduidade regular ao tratamento. Dentre os pacientes abordados, 13 se recusaram a participar do estudo, 18 desistiram da pesquisa e não completaram a coleta de dados. Assim a amostra foi constituída de 69 participantes.

### ***Procedimento para a coleta dos dados***

Para a coleta de dados foi aplicado um roteiro de entrevista com o qual foram levantados os dados sócio demográficos, características das lesões, sinais e sintomas de infecção clássicos (dor, edema, rubor, calor e exsudato purulento), além daqueles considerados como adicionais pela *EWMA*<sup>(2)</sup>, ou seja: celulite; aumento de temperatura local da pele; aumento de dor na úlcera/mudança na natureza da dor; formação de novas úlceras nas margens inflamadas de úlcera pré-existente; ampliação da ferida nas margens inflamadas; descoloração do tipo opaca e/ou tijolo vermelho escuro; tecido de granulação friável que sangra facilmente; aumento da viscosidade do exsudato; aumento do volume do exsudato; mau cheiro; nova manifestação de ferida de coloração amarronzada; aparecimento súbito/ aumento da quantidade de esfacelos; repentino aparecimento de manchas necróticas negras; aumento do tamanho da úlcera.

A presença de dor foi avaliada tanto na lesão quanto na borda, a hiperemia foi avaliada na pele perilesão e na borda, o aumento da temperatura foi investigado na pele perilesão e o edema foi avaliado na pele perilesão e ainda mediante análise de volume de exsudato na lesão.

Realizou-se avaliação microbiológica das lesões para a verificação da presença de micro-organismos, sendo que, no presente estudo focalizou-se especificamente os bastonetes Gram-negativos.

### ***Avaliação microbiológica***

A coleta dos espécimes se deu conforme a técnica de Levine (1976)<sup>(16)</sup>.

Os espécimes foram inoculados em meio para transporte (meio de Stuart) e enviados ao laboratório do Instituto de Patologia e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, a temperatura ambiente em até 12 horas.

Para o isolamento primário dos bastonetes Gram-negativos, as amostras foram semeadas em ágar MacConkey e incubadas por 24 horas a 35°C. Em seguida, os BGN foram identificados por meio de provas bioquímicas padronizadas<sup>(17)</sup>.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (protocolo 041/2009).

Os dados foram analisados utilizando o *Software Epiinfo*® (versão 6), por meio do qual realizou-se procedimentos de estatística descritiva (frequências absolutas e relativas, medidas de tendência central) e inferencial (análise de proporções, teste Qui-quadrado) adotando-se  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Foram avaliados 69 pacientes com 98 lesões. Predominou o gênero masculino (58%) com idade de 28 a 93 anos. Os pacientes apresentaram de uma a cinco úlceras, com Mo=1 lesão e Md=2 lesões. Verificou-se que o tempo de duração das úlceras variou de dois meses a 66 anos (Md=2,25 anos e Mo=5 anos).

Verificou-se, quanto aos sinais clássicos de infecção nas úlceras venosas, que se destacaram a dor no leito da lesão (70,4%), dor nas bordas (64,3%) e o exsudato purulento (62,3%) (Tabela 1).

Identificou-se que quanto ao estágio clínico das lesões, estas foram classificadas em estágios III (71,4%) e II (28,6%).

Verificou-se que em 73 (74,5%) das lesões houve crescimento de bastonetes Gram-negativos (BGN). Ao analisarem-se as proporções entre os sinais e sintomas clássicos de infecção das úlceras e a presença de BGN nestas, observou-se que estas foram semelhantes, no entanto não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 1).



**Tabela 1.** Distribuição dos sinais e sintomas clássicos de infecção em úlceras venosas de pacientes atendidos na rede básica de saúde e suas proporções segundo o resultado da cultura

| Sinais clássicos de infecção |     | n(98) | %    | Presença de bastonetes Gram-negativos |      |                |      |
|------------------------------|-----|-------|------|---------------------------------------|------|----------------|------|
|                              |     |       |      | sim(73)                               | %    | X <sup>2</sup> | p    |
| Pele perilesional            |     |       |      |                                       |      |                |      |
| Hiperemia                    | Sim | 54    | 55,1 | 38                                    | 70,4 | 1,07           | 0,30 |
|                              | Não | 44    | 44,9 | 35                                    | 79,5 |                |      |
| Hipertermia                  | Sim | 52    | 53,0 | 40                                    | 76,9 | 0,35           | 0,55 |
|                              | Não | 46    | 47,0 | 33                                    | 71,7 |                |      |
| Borda                        |     |       |      |                                       |      |                |      |
| Hiperemia                    | Sim | 38    | 38,7 | 26                                    | 68,4 | 1,20           | 0,27 |
|                              | Não | 60    | 61,3 | 47                                    | 78,3 |                |      |
| Edema                        | Sim | 35    | 35,7 | 25                                    | 71,4 | 0,27           | 0,60 |
|                              | Não | 63    | 64,3 | 48                                    | 76,2 |                |      |
| Dor                          | Sim | 63    | 64,3 | 46                                    | 73,0 | 0,20           | 0,65 |
|                              | Não | 35    | 35,7 | 27                                    | 77,1 |                |      |
| Dor no leito da lesão        | Sim | 69    | 70,4 | 52                                    | 75,4 | 0,09           | 0,75 |
|                              | Não | 29    | 29,6 | 21                                    | 72,4 |                |      |
| Exsudato purulento           | Sim | 50    | 51,0 | 40                                    | 80,0 | 1,63           | 0,20 |
|                              | Não | 48    | 49,0 | 33                                    | 68,7 |                |      |

Ao avaliar-se a distribuição dos sinais e sintomas adicionais de infecção nas úlceras destacaram-se: descoloração do tipo opaca e/ou tijolo vermelho escuro (79,6%); aumento do volume do exsudato (74,5%); aumento de temperatura local da pele (65,3%); mau cheiro (61,2%) e aumento de dor na úlcera/mudança na natureza da dor (54,1%) conforme a tabela 2.

Em relação à distribuição das proporções sinais e sintomas clínicos adicionais de infecção e o resultado de cultura observou-se que para a maioria dos sinais não houve diferença significativa, a exceção de celulite ( $p=0,04$ ) e tecido de granulação friável que sangra facilmente ( $p=0,04$ ) (Tabela 2).

**Tabela 2.** Distribuição dos sinais adicionais de infecção em úlceras venosas de pacientes atendidos na rede básica de saúde e das proporções segundo o resultado da cultura

| Sinais adicionais de infecção                                            |     | n(98) | %    | Bastonetes Gram-negativos |      |                |             |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|-------|------|---------------------------|------|----------------|-------------|
|                                                                          |     |       |      | Sim(73)                   | %    | X <sup>2</sup> | p           |
| Aumento do volume do exsudato                                            | sim | 73    | 74,5 | 55                        | 75,3 | 0,11           | 0,74        |
|                                                                          | não | 25    | 25,5 | 18                        | 72,0 |                |             |
| Descoloração do tipo opaca/ tijolo vermelho escuro                       | sim | 78    | 79,6 | 55                        | 70,5 | 3,18           | 0,07        |
|                                                                          | não | 20    | 20,4 | 18                        | 90,0 |                |             |
| Aumento de temperatura local da pele                                     | sim | 64    | 65,3 | 46                        | 71,8 | 0,66           | 0,41        |
|                                                                          | não | 34    | 34,7 | 27                        | 79,4 |                |             |
| Mau cheiro                                                               | sim | 61    | 62,2 | 46                        | 75,4 | 0,07           | 0,79        |
|                                                                          | não | 37    | 37,8 | 27                        | 72,9 |                |             |
| Aumento da viscosidade do exsudato                                       | sim | 42    | 42,9 | 33                        | 78,5 | 0,64           | 0,42        |
|                                                                          | não | 56    | 57,1 | 40                        | 71,4 |                |             |
| Aumento de dor na úlcera/mudança na natureza da dor                      | sim | 53    | 54,1 | 39                        | 73,6 | 0,05           | 0,82        |
|                                                                          | não | 45    | 45,9 | 34                        | 75,5 |                |             |
| Tecido de granulação friável que sangra facilmente                       | sim | 36    | 36,7 | 31                        | 86,1 | 4,84           | <b>0,04</b> |
|                                                                          | não | 62    | 63,3 | 42                        | 67,7 |                |             |
| Aparecimento súbito/ aumento da quantidade de esfacelos                  | sim | 36    | 36,7 | 27                        | 75,0 | 0,01           | 0,92        |
|                                                                          | não | 62    | 63,3 | 46                        | 74,2 |                |             |
| Ampliação da ferida nas margens inflamadas                               | sim | 20    | 20,4 | 14                        | 70,0 | 0,00           | 0,94        |
|                                                                          | não | 78    | 79,6 | 54                        | 69,2 |                |             |
| Aumento do tamanho da úlcera                                             | sim | 18    | 18,4 | 13                        | 72,2 | 0,00*          | 0,95        |
|                                                                          | não | 80    | 81,6 | 60                        | 75,0 |                |             |
| Celulite                                                                 | sim | 21    | 21,4 | 12                        | 57,1 | 4,23           | <b>0,04</b> |
|                                                                          | não | 77    | 78,6 | 61                        | 79,2 |                |             |
| Formação de novas úlceras nas margens inflamadas de úlcera pré-existente | sim | 14    | 14,3 | 10                        | 71,4 | 0,00*          | 0,96        |
|                                                                          | não | 84    | 85,7 | 63                        | 75,0 |                |             |
| Repentino aparecimento de manchas necróticas negras                      | sim | 10    | 10,2 | 06                        | 60,0 | 0,53*          | 0,47        |
|                                                                          | não | 88    | 89,8 | 67                        | 76,1 |                |             |
| Nova manifestação de ferida de coloração amarronzada                     | sim | 03    | 3,1  | 02                        | 66,6 | -              | -           |
|                                                                          | não | 95    | 96,9 | 71                        | 74,3 |                |             |

\*X<sup>2</sup> com correção de Yates

## DISCUSSÃO

Compreender a presença de sinais e sintomas clínicos de infecção em úlceras venosas e a sua relação com a presença de bastonetes Gram-

negativos consiste numa contribuição inédita para a área da saúde, uma vez que a literatura<sup>(2,10,18-19)</sup> tem trazido aspectos sobre a interferência dos micro-organismos no reparo destas lesões, e os aspectos abordados neste estudo tem sido observado separadamente por outros estudiosos.

Esta abordagem é imprescindível para a prática clínica de enfermagem e outros campos da saúde. A identificação de sinais e sintomas clínicos de infecção em úlceras venosas subsidia a assistência prestada e aliada a esta conduta a análise microbiológica tem sido complementar<sup>(12)</sup>. Para o enfermeiro o reconhecimento destes, bem como dos estágios clínicos de infecção é de suma importância para a instituição de terapêutica adequada no tratamento destes pacientes.

Os sinais e sintomas clássicos de infecção em feridas são reconhecidos desde a década de 50<sup>(2)</sup> e estudos têm apresentado maneiras diversas de identificá-los<sup>(2,20)</sup>.

No presente estudo identificou-se que nas úlceras venosas a presença de dor no leito da lesão e nas bordas e o exsudato purulento foram os sinais e sintomas de infecção clássico mais frequente. Porém ao avaliar-se a relação destes sinais com o resultado de cultura positiva para BGN, observou-se que, de um modo geral, não existe. Entre os sinais e sintomas clínicos de infecção estudados, não foi identificado qualquer um deles que sugerisse ou indicasse a presença de BGN. Isto pode ser devido ao fato destas lesões apresentarem evidências de processo inflamatório inespecífico e não de processo infeccioso<sup>(13)</sup>.

Em estudo<sup>(10)</sup> cujo objetivo foi testar a validade dos sinais clássicos de infecção e os sinais específicos para cicatrização em feridas por segunda intenção observou-se que os sinais com melhor predição para infecção foram: aumento da dor, presença de granulação friável, odor fétido e tunelização, estando 11 (30,5%) das lesões infectadas, não sendo os sinais clássicos preditores, embora presentes.

Para os sinais e sintomas clínicos adicionais no presente estudo a descoloração do tipo opaca e/ou tijolo vermelho escuro; aumento do volume do exsudato; aumento de temperatura local da pele; mau cheiro e aumento de dor na úlcera/mudança na natureza da dor apresentaram-se mais prevalentes. No entanto ao estudar a relação entre os sinais e sintomas

adicionais de infecção e o resultado de cultura positivo para os BGN, identificou-se apenas relação entre celulite, tecido de granulação friável que sangra facilmente e cultura positiva para BGN, o que indica que a presença destes sinais e sintomas prediz que há infecção na lesão. Segundo a *EWMA*<sup>(13)</sup> alterações no estado geral do paciente como febre e elevação de células brancas juntamente com celulite é indicativo de infecção, de acordo com o estágio clínico três de infecção da lesão recomenda-se terapêutica antimicrobiana sistêmica.

Em relação ao estágio clínico verificou-se que as lesões encontravam-se com maior frequência no estágio três, sendo os sinais mais prevalentes: aumento do volume do exsudato, descoloração do tipo opaca ou tijolo vermelho escuro, aumento da temperatura local, mau cheiro, aumento ou mudança na natureza da dor. Indicando a necessidade de terapêutica tanto tópica quanto sistêmica, para o restabelecimento da lesão<sup>(13)</sup>.

No intuito de verificar os sinais e sintomas adicionais preditores de infecção estudo<sup>(2)</sup> definiu critérios para identificação de infecção em feridas dentre elas a úlcera venosa. Foram instituídos escores de concordância para cada sinal ou sintoma: alto, com escore entre 8 e 9, médio, entre 6 e 7 e baixo entre 4 e 5. Observou-se que para celulite, odor fétido, dor, cicatrização sem evolução, aumento do exsudato e rompimento da ferida, os escores foram altos (8 e 9), sendo estes preditores de infecção nestas lesões. Já no presente estudo apenas dois sinais foram preditores de infecção, a celulite e o tecido de granulação que sangra facilmente.

O fato de sinais e sintomas clássicos e adicionais não terem sido preditores de infecção nas úlceras venosas analisadas, suscita reflexões acerca dos aspectos relacionados ao processo inflamatório, processo de cicatrização, e características das úlceras venosas, que por vezes se interligam e/ou se sobrepõe ao processo de infecção inteferindo na identificação do quadro infeccioso da lesão.

O processo inflamatório ocorre após uma injúria e é classicamente caracterizado pelos sinais e sintomas de calor local, rubor, edema, dor e perda da função<sup>(10)</sup> com a finalidade de proteção do organismo na reparação da lesão. Já em relação ao processo de cicatrização a literatura<sup>(21)</sup> refere que para que o processo da reparação tecidual aconteça é necessário que

ocorra hemostasia, inflamação, proliferação e maturação e para as feridas crônicas ocorre um retardo na fase inflamatória interferindo no seu restabelecimento.

Nas úlceras ocorre uma excessiva produção de células inflamatórias, fazendo com que haja um aumento na concentração do fator transformador de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), reduzindo a concentração de fatores que promovam a proliferação, etapa seguinte. Assim reprimindo a atividade mitogênica das células, levando a uma inflamação patogênica desencadeada por descontrolada cadeia que leva a mais inflamação<sup>(22)</sup>, permanecendo presentes os sinais e sintomas inflamatórios na lesão.

Em relação a etiologia das úlceras venosas existem várias teorias, uma delas a teoria dos leucócitos, a qual discorre que na presença da hipertensão venosa dos membros inferiores (uma das causas de insuficiência venosa<sup>(23-24)</sup> decorrente do fluxo sanguíneo retrógrado<sup>(25)</sup>), ocorre diminuição na velocidade da passagem do sangue, permitindo o agrupamento de células brancas na parede do endotélio. A obstrução vascular leva a isquemia tecidual local e bloqueio da passagem de oxigênio pelas hemácias, ocasionando a liberação de mediadores inflamatórios, ocasionando a formação de úlceras venosas<sup>(26)</sup>.

No que se refere as características clínica clássicas das úlceras venosas a presença de exsudato de intensidades variadas, edema na região do tornozelo e/ou acima, a inflamação em forma de celulite e a dor no membro afetado<sup>(27-28)</sup>, são características de processo inflamatório e também infeccioso.

As feridas crônicas são na maioria das vezes contaminadas e/ou colonizadas por diversos micro-organismos<sup>(18)</sup> e a presença de micro-organismos nas úlceras tem sido analisada<sup>(19)</sup>. Considera-se que este fato leve ao desenvolvimento de inflamação crônica interferindo no restabelecimento da lesão<sup>(13)</sup>.

Quando ocorre infecção nas úlceras venosas as bactérias contribuem com a cronificação das lesões por meio da produção de toxinas, elevando a quantidade de citocinas pró-inflamatórias. As exotoxinas produzidas pelas bactérias, atacam as células produzindo necrose tecidual, promovendo retardo na cicatrização da lesão<sup>(30)</sup>, permanecendo na fase inflamatória.

A análise microbiológica deve ser instituída, mediante o estágio clínico de infecção nas úlceras venosas, pois a presença de BGN tem sido reportada pela literatura como fator de risco para amputação de membro inferior<sup>(31)</sup>, rejeição na pega de enxerto de pele em pacientes com úlceras venosas<sup>(19)</sup> e principalmente ao desenvolvimento de mecanismos de resistência levando ao insucesso na terapêutica estabelecida<sup>(5)</sup>.

A avaliação clínica destas lesões tem sido até o momento o subsídio para a instituição de terapêutica<sup>(13)</sup>, no entanto o acompanhamento clínico do enfermeiro no atendimento a pacientes com úlcera venosa com sinal ou sintoma de infecção deve ser criterioso no sentido de monitorar o estágio da infecção.

## **CONCLUSÃO**

O estudo permitiu verificar sinais e sintomas de infecção mais prevalentes nos pacientes com úlceras venosas atendidos em unidades de saúde na atenção primária, demonstrando que embora estes estejam presentes, não significa que a lesão esteja infectada.

Possibilitou a identificação do estágio clínico de infecção das lesões, reforçando a necessidade dos profissionais de saúde utilizarem a avaliação clínica mediante estágios, como prática interdisciplinar, o que contribuirá com tomada de decisão terapêutica o que pode levar a redução de micro-organismos multirresistentes.

Observou-se que para os sinais e sintomas adicionais de infecção nas úlceras venosas, somente para celulite e tecido de granulação friável que sangra facilmente existe relação entre o sinal clínico e o resultado da cultura para BGN.

O enfermeiro tem papel primordial na assistência prestada a estes indivíduos, sendo imprescindível o conhecimento deste acerca do desenvolvimento destas lesões, suas características clássicas e estágios clínicos de infecção, bem como fazer uso destes indicadores.

Considera-se ainda importante a realização de estudos que avaliem a sensibilidade, especificidade e valores preditivos para o estabelecimento de análise microbiológica para os pacientes com úlcera venosa.

## **Agradecimentos**

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Goiás – FAPEG. À Lara Stefânia Netto de Oliveira Leão (Coordenadora do laboratório de microbiologia – IPTSP/UFG e Ana Beatriz Mori Lima (Farmacêutica e Bioquímica).

#### **REFERÊNCIAS:**

1. Gardner SE, Frantz RA, Saltzman CL, Dodgson KJ. *Staphylococcus aureus* is associated with high microbial load in chronic wounds. Wounds. 2004;16(8): 251-257.
2. European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Identifying criteria for wound infection. London: MEP Ltd, 2005. Available from: <http://ewma.org/english/position-documents/all-issues.html#c500>.
3. oneman EW et al. Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
4. Levin ASS, Arruda EAG, Oliveira MS. Infecções por *Pseudomonas*. In: Veronesi: tratado de infectologia. Editor científico: Roberto Focaccia. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p.971-981.
5. Ferreira ML, Dantas RCC, Moreira APA, Batistão DWF, Gontijo Filho PP. et al. Incidência de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases em hospital universitário: distribuição endêmica e epidêmica. Braz J Infect Dis. 2011;15(Suppl 1):102.
6. Moreira MR, Rocha LA, Guimarães MP, Barbaresco LF, Melo GB et al. Uso de antimicrobianos, etiologia e perfil de resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) responsáveis por pneumonias associadas a ventilação mecânica (PAVs) em unidade de terapia intensiva de um hospital universitário brasileiro. Braz J Infect Dis. 2011;15(Suppl 1):171.
7. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Microbiologia de Brock. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
8. Villegas MV, Blanco MG, Sifuenes-Osornio J, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America – 2008 update from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART). Braz J Infect Dis. 2011;15(1): 34-39.

9. Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CMM. Identificação laboratorial de  $\beta$ -Lactamases de espectro estendido (ESBLs) – revisão. RBAC. 2006;38(3):171-77.
10. Gardner SE, Frantz RA, Doebbeling BN. The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection. Wound Rep Regen. 2001;9:178-186.
11. White RJ, Cutting KF. Critical Colonization – The Concept under Scrutiny. Ostomy Wound Manage. 2006;52(11):50-6.
12. Cooper RA, Ameen H, Prince P, McCulloch DA, Harding KG. A clinical investigation into the microbiological status of 'locally infected' leg ulcers. Int Wound J. 2009;6:453-62.
13. European Wound Management Association. An integrated approach to managing wound infection [Internet]. London: MEP Ltd; 2006 [cited 2012 feb 20]. Available from: [http://ewma.org/fileadmin/user\\_upload/EWMA/pdf/Position\\_Documents/2006\\_Wound\\_Infection\\_/English\\_pos\\_doc\\_final.pdf](http://ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA/pdf/Position_Documents/2006_Wound_Infection_/English_pos_doc_final.pdf).
14. Pinto IC, Passeri IAG, Silva DS, Oliveira MM. (Re)organizando a sala de curativo do Dentro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Acta Paul Enferm. 2005;18(1):89-93.
15. Martins MA, Tipple AFV, Reis C, Santiago SB, Bachion MM. Úlcera crônica de perna de pacientes em tratamento ambulatorial: análise microbiológica e de suscetibilidade antimicrobiana. Cienc Cuid Saúde. 2010;9(3):464-70.
16. Levine NS, Lindberg RB, Mason AD, Pruitt BA Jr. The quantitative swab culture and smear: a quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wound. J Trauma, 1976;16(2):89-94.
17. NCCLS - National Committee For Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 1907-1898 USA, 2003.
- 18- Landis SJ. Chronic Wound Infection and Antimicrobial Use. Adv Skin Wound Care 2008;21:531-40.



- 19.Høgsberg T, Bjarnsholt T, Thomsen JS, Kirketerp-Møller K. Success rate of split-thickness skin grafting of chronic venous leg ulcers depends on the presence of *Pseudomonas aeruginosa*: a retrospective study. PLoS ONE. 2011; 6(5).
- 20.Gardner SE, Frantz RA, Park H, Scherubel M. The inter-rater reliability of the clinical signs and symptoms checklist and diabetic foot ulcers. Ostomy Wound Manage. 2007;53(1):46-51.
- 21.Ferreira MC, Tuma Jr. P, Carvalho VF, Kamamoto F. Complex wounds. Clinics. 2006; 61(6):571-8.
- 22.Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismo envolvidos na cicatrização: uma revisão. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2005;41(1).
- 23.Briggs M, Closs SJ. The prevalence of leg ulceration: a review of the literature. Journal EWMA. 2003;3(2):14-9.
- 24.Nunes JP. Avaliação da assistência à saúde dos portadores de úlceras venosas atendidos no programa saúde da família do município de Natal/RN [dissertação]. Natal: Centro de Ciências da Saúde/UFRN; 2006. 131 p.
- 25.Carmo SS, Castro CD, Rios VS, Sarquis MGA Atualidades na assistência de enfermagem a portadores de úlcera venosa. Rev. Eletr. Enf. [Internet]. 2007 [cited 2006 mar 02];9(2):506-517. Available from: <http://www.fen.ufg.br/revista/v9/n2/v9n2a17.htm>
- 26.Doughty, BD, Waldrop J, Ramundo J. Lower-extremity ulcers of vascular etiology. In: Bryant, RA, Nix DP. Acute & chronic wounds. 3<sup>a</sup> ed. Saint Louis (MO): Mosby, 2000. p. 265-295.
- 27.Grey JE, Enoch S, Harding KG. Venous and arterial leg ulcers. BMJ 2006; 11(323):347-350.
- 28.Conferencia Nacional de Consenso Sobre Úlceras de la Extremidad Inferior (CONUEI). España: EdikaMed S. L.; 2009.
- 29.Kingsley A. A proactive approach to wound infection. Nurs Stand. 2001;15(30):50-4, 56, 58.
30. Ambrosch A, Lobmann R, Pott A, Preibler J. Interleukin-6 concentrations in wound fluids rather than serological markers are useful in assessing bacterial triggers of ulcer inflammation. Int Wound J. 2008;5:99-106.
- 31.Santos VP, Silveira DR, Caffaro RA. Risk factors for primary major amputation in diabetic patients. São Paulo Med J. 2006;124(2):66-70.

## 5 CONCLUSÃO

---

Baseado nos dados apresentados sobre a análise clínica e microbiológica das úlceras venosas, verificou-se que:

- as úlceras ocorreram em pessoas com idade de 28 a 93 anos, predominantemente no gênero masculino (58%); apresentaram-se como lesões únicas ou múltiplas, variando de uma a cinco úlceras, com Mo=1 lesão e Md=2 lesões; tinham duração que variou de dois meses a 66 anos (Md=2,25 anos e Mo=5 anos).

- houve crescimento de bastonetes Gram-negativos em 74,5% das 98 lesões; as enterobactérias estiveram presentes em 53,8% e bastonetes Gram-negativos não fermentadores em 46,2% das lesões;

- dentre as enterobactérias prevaleceu a espécie *Escherichia coli* (24,5%), seguida de *Enterobacter aerogenes*, *Pantoea agglomerans* e *Proteus mirabilis* com 12,2% respectivamente;

- quanto aos bastonetes Gram-negativos não fermentadores, destacou-se o gênero *Pseudomonas* e em especial a espécie *P. aeruginosa*;

- em relação ao perfil de suscetibilidade das enterobactérias, destacaram-se a resistência à tetraciclina (38,8%), à amoxicilina-ácido clavulânico (26,5%). Entre as *P. aeruginosa*, a maior resistência foi observada para cefoxitina (100%);

- 30% dos micro-organismos do grupo CESP e 100% das *P. aeruginosa* foram resistentes a cefoxitina;
- os micro-organismos do grupo CESP sensíveis a cefoxitina apresentaram-se positivos (37,5%) a produção de enzima AmpC;

- em relação a metalo-beta-lactamase 8% das *P. aeruginosa* foram positivas para esta enzima;
- quanto a produção da enzima ESBL, esta não foi detectada.

Diante dos achados relativos à suscetibilidade antimicrobiana e a produção de  $\beta$ -lactamases em bastonetes Gram-negativos, isolados das úlceras venosas, é necessária a instituição de vigilância microbiológica para esta população, pois possibilitará aos serviços o conhecimento sobre o perfil de resistência dos micro-organismos presentes nas lesões. Esse procedimento contribuirá para a redução do desenvolvimento e disseminação de micro-organismos multirresistentes nesta população na atenção primária.

Quanto à avaliação dos sinais e sintomas de infecção e a relação destes com a presença de bastonetes Gram-negativos, concluiu-se que:

- o estágio três de infecção foi o mais prevalente (71,4%), sendo os sinais e sintomas: aumento do volume do exsudato, descoloração do tipo opaca ou tijolo vermelho escuro, aumento da temperatura local, mau cheiro, aumento ou mudança na natureza da dor, os predominantes;
- celulite e tecido de granulação friável que sangra facilmente esteve associado ao resultado de cultura positiva para BGN, não havendo significância estatística para os demais sinais e sintomas.

Verificou-se neste estudo ser de suma importância a realização de avaliação clínica das úlceras segundo o estágio de infecção, pois esta

subsidiará a solicitação da avaliação microbiológica com o intuito de auxiliar na escolha da terapêutica pela equipe multiprofissional.

A identificação de infecção nas UV deve ser norteadada pelo conhecimento acerca da etiologia, características clássicas e estágios clínicos de infecção de forma a assegurar uma terapêutica assertiva. Observa-se ser imprescindível a instituição de protocolos de atendimento para os pacientes com úlceras venosas de difícil processo de cicatrização, como meio de padronização das condutas dos profissionais que prestam atendimento a esta população.

Espera-se que estes dados subsidiem os gestores da atenção básica de saúde para que ocorram mudanças nas políticas públicas de saúde, no que se refere ao atendimento aos pacientes com úlceras venosas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

O contato com os pacientes com úlceras venosas foi gratificante, pois observamos que apesar dos problemas de saúde e a falta de recursos financeiros para irem à unidade realizar os curativos, existia otimismo dos participantes do estudo, os quais viam em nós a esperança para solucionarem os seus problemas relacionados às úlceras, demonstrando carinho e respeito pelo nosso trabalho.

O desenvolvimento deste estudo possibilitou a aproximação com outros profissionais da área de saúde. No que se refere aos microbiologistas, conhecer o processo de identificação e fenotipagem de micro-organismos fez com que compreendêssemos que análises microbiológicas exigem um trabalho minucioso, metódico e de muita concentração para que os resultados sejam satisfatórios.

Trabalhar com uma equipe de pesquisa composta por vários integrantes foi uma experiência por vezes estressante, pois para a coleta dos espécimes para a análise microbiológica, necessitávamos de um esforço coletivo, para atingirmos as metas estabelecidas, o que exige o envolvimento de todos.

Com isso apreendi que o desenvolvimento de pesquisa envolvendo várias frentes de trabalho requer da equipe maturidade, respeito, cumplicidade e colaboração. No que se refere à liderança de um grupo de pesquisas, é necessário saber lidar com o estágio de desenvolvimento intelectual dos indivíduos, suas prioridades, valores culturais, conflitos de

gerações e ainda as questões pessoais, o que se torna tarefa ainda mais complexa, quando se trata de projetos com prazos para a realização das atividades.

Enquanto pesquisadora em prevenção e controle de infecção relacionada aos cuidados em saúde, embora já soubesse da importância do conjunto de medidas para a prevenção e controle de infecção, com o estudo minhas crenças foram reforçadas quanto a serem imprescindíveis em todos os cenários de prática profissional, mesmo onde aparentemente não estamos expondo os indivíduos a riscos.

Percebi que estas medidas muitas vezes podem ser banalizadas pelos gestores e profissionais da área de saúde dos serviços por onde passamos, o que é frustrante, uma vez que temos à disposição o que há de mais atual em termos de conhecimento científico para a atuação profissional na área de saúde, em relação à prevenção e controle de infecção, não sendo campo privativo dos profissionais que atuam em CCIH.

Com a finalização deste estudo fecho mais um ciclo de aprimoramento intelectual e vislumbro novos horizontes enquanto pessoa, enfermeira, docente, pesquisadora e controladora de infecções.

## REFERÊNCIAS

---

Abbade LPF, Lastória, S. Abordagem de pacientes com úlcera da perna de etiologia venosa. *An bras dermatol.* 2006;81(4):509-22.

Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, Kurokawa H, Yagi T, Fujiwara H et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):40-3.

Ambrosch A, Lobmann R, Pott A, Preibler J. Interleukin-6 concentrations in wound fluids rather than serological markers are useful in assessing bacterial triggers of ulcer inflammation. *Int Wound J.* 2008;5(1):99-106.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036): 321-31.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância a Saúde. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. 1ª. ed. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde, 2004.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância a Saúde. Nota Técnica nº 1. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde, 2010.

Azoubel R, Torres GV, Silva LWS, Gomes FV, Reis A. Efeitos da terapia física descongestiva na cicatrização de úlceras venosas. *Rev Esc Enferm USP.* 2010;44(4):1085-92.

Balbino CA, Pereira LM, Curi R. Mecanismo envolvidos na cicatrização: uma revisão. *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 2005;41(1).

Baptista CMC, Castilho V. Levantamento do custo do procedimento com bota de unna em acientes com úlcera venosa. *Rev Latino-am Enfermagem.* 2006; 14(6):129-35.

Barros E, Bittencourt H, Caramori ML, Machado A. Antimicrobianos: consulta rápida. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2003.

Barth AL, Barros E, Machado A. Resistência bacteriana In: Barros E, Bittencourt H, Caramori ML, Machado A. Antimicrobianos: consulta rápida. 3ª Ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2003. p. 27-31.

Bergonse FN, Rivitti EA. Avaliação da circulação arterial pela medida do índice tornozelo/braço em doentes de úlcera venosa crônica. An. Bras. Dermatol. 2006;81(2):131-5.

Bicudo EL, Macedo VO, Carrara MA, Castro FFS, Rage RI. Nosocomial outbreak of *Pantoea agglomerans* in Pediatric Urgent Care Center. Braz J Infect Dis. 2007;11(2):281-4.

Boothman, S. Iodine white paper : the use of iodine in wound therapy. Systagenix Wound Manage. 2009.

Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. Clin Microbiol Rev. 2001;14(2):244-69.

Bowler PG. The 10(5) bacterial growth guideline: reassessing its clinical relevance in wound healing. Ostomy Wound Manage. 2003;49(1):44-53.

Borges EL. Tratamento tópico de úlcera venosa: proposta de uma diretriz baseada em evidência. [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Escola de Enfermagem; 2005. 305 p.

Bombin JF, Contreras JT, Bronfman MA, Fernández JV, Orrego AD et al. Es lá insuficiencia de lãs venas perforantes tibiales de la pierna de origem postflebítico? Rev. Chilena de Cirurgia. 2002;54(6):622-7.

Briggs M, Closs SJ. The prevalence of leg ulceration: a review of the literature. Journal EWMA. 2003;3(2):14-9.

Bueris V, Elias Jr WP, Piazza RMF, Taddei CR, Campos LC, et al. Infecções causadas por *Escherichia coli*. In: Veronesi: tratado de infectologia. Editor



científico: Roberto Focaccia. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 983-89.

Busch K. Excitement in the beta-lactamase arena. J Antimicrob Chemother. 1989;24(6):831-6.

Busch K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for  $\beta$ -Lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob. Agents Chemother. 1995;39(6):1211-33.

Carmo SS, Castro CD, Rios VS, Sarquis MG. Amorim Atualidades na assistência de enfermagem a portadores de úlcera venosa. Rev Eletr Enf [Internet]. 2007 [cited 2006 marc 02];9(2):506-17. Available from: <http://www.fen.ufg.br/revista/v9/n2/v9n2a17.htm>

Chen S, Hu F, Liu Y, Zhu D, Wang H. et al. Detection and spread of carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* in a teaching hospital in China. Am J Infect Control. 2011;39(9):55-60.

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; nineteen. Informational Supplement. document M100-S19, 2009;29(3).

CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-first. Informational Supplement (M02-A10 and M07-A08). document M100-S21, 2011;30(15).

Closs SJ, Nelson EA, Briggs M. Can venous and arterial leg ulcers be differentiated by the characteristics of the pain they produce. J Clinical Nursing. 2008;637-44.

Conferencia Nacional de Consenso Sobre Úlceras de la Extremidad Inferior (CONUEI). España: EdikaMed S. L.; 2009.

Cooper RA, Ameen H, Prince P, McCulloch DA, Harding KG. A clinical investigation into the microbiological status of 'locally infected' leg ulcers. Int Wound J. 2009;6(6):453-62.

Cury AP, Carmo DB, Maffucci M, Caiaffa Júnior HH, Almeida Júnior JN, Rossi F. Valor preditivo negativo do teste de Hodge modificado na exclusão de enterobactérias produtoras de KPC. Braz J Infect Dis. 2011;15 (Suppl 1): 7.

Cutting KF, White RJ. Criteria for identifying wound infection – revisited. Wound Ostomy Manage. 2005;51(1):28-34.

Dalmarco EM, Blatt SL, Córdova CMM. Identificação laboratorial de  $\beta$ -Lactamases de espectro estendido (ESBLs) – revisão. Rev. bras. anal. clin. 2006;38(3):171-7.

Davies CE, Hill KE, Newcombe RG, Stephens P, Wilson MJ, Harding KG, et al. A prospective study of the microbiology of chronic venous leg ulcers to reevaluate the clinical predictive value of tissue biopsies and swabs. Wound Repair and Regen. 2007;15(1):17-22.

Dealey C. Cuidando de feridas: um guia para as enfermeiras. São Paulo: Editora Atheneu; 2008.

Diament D, Lomar AV. Guia prático de antibióticos e antibioticoterapia.. In: Veronesi: tratado de infectologia. Editor científico: Roberto Focaccia. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 47-87.

Dienstmann R, Picoli SU, Meyer G, Schenkel T, Steyer J. Avaliação fenotípica de enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2010; 46(1):23-27.

Doughty, BD, Waldrop J, Ramundo J. Lower-extremity ulcers of vascular etiology. In: Bryant, RA, Nix DP. Acute & chronic wounds. 3ª ed. Saint Louis (MO): Mosby; 2000. p.265-295.

Dow G. Bacterial swabs and the Chronic Wound: when, How, and what do they mean. Ostomy Wound Manage. 2003;49(5A Suppl):8-13.

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Bacterial nomenclature up-to-date. Leibniz Institute. Braunschweig, Germany 2012.

Edwards R, Harding KG. Bacteria and wound healing. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2004;17:91-6.

Etufugh CH, Phillips TJ. Venous ulcer. *Clinics in Dermatology*. 2007;25:121-30.

European Wound Management Association (EWMA). Position Document: Understanding compression therapy. London: MEP Ltd, 2003.

European Wound Management Association. Identifying criteria for wound infection [Internet]. London: MEP Ltd; 2005 [cited 2012 feb 14]. Available from:

[http://ewma.org/fileadmin/user\\_upload/EWMA/pdf/Position\\_Documents/2005\\_Wound\\_Infection\\_English\\_pos\\_doc\\_final.pdf](http://ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA/pdf/Position_Documents/2005_Wound_Infection_English_pos_doc_final.pdf).

European Wound Management Association. An integrated approach to managing wound infection [Internet]. London: MEP Ltd; 2006 [cited 2012 feb 14]. Available from:

[http://ewma.org/fileadmin/user\\_upload/EWMA/pdf/Position\\_Documents/2006\\_Wound\\_Infection\\_English\\_pos\\_doc\\_final.pdf](http://ewma.org/fileadmin/user_upload/EWMA/pdf/Position_Documents/2006_Wound_Infection_English_pos_doc_final.pdf).

Fernandes LF, Pimenta FC, Fernandes FF. Isolamento e perfil de suscetibilidade de bactérias de pé diabético e úlcera de estase venosa de pacientes admitidos no pronto-socorro do principal hospital universitário do estado de Goiás, Brasil. *J Vasc Bras*. 2007;6(3):211-217.

Ferreira ML, Dantas RCC, Moreira APA, Batistão DWF, Gontijo Filho PP, Ribas RM. Incidência de bacteremia por *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases em hospital universitário: distribuição endêmica e epidêmica. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(Suppl 1):102.

Ferreira MC, Tuma Júnior P, Carvalho VF, Kamamoto F. Complex wounds. Clinics. 2006;61(6):571-8.

Figueiredo DQ, Castro LFS, Santos KRN, Teixeira LM, Mondino SSB. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. J. Bras. Patol. Med. Lab. 2009;45(3):177-84.

Fonseca FIRM, Dedivitis RA, Smokou A, Lascane E, Cavaleiro RA. et al. Frequência de automedicação entre acadêmicos de faculdade de medicina. Diagn Tratamento. 2010;15(2):53-7.

Frade MAC, Cursi IB, Andrade FF, Soares SC, Ribeiro WS, Santos SV, et al. Úlcera de perna: um estudo de casos em Juiz de Fora – MG (Brasil) e região. An Bras Dermatol. 2005;80(1):41-6.

França LHG, Tavares V. Insuficiência venosa crônica. Uma atualização. J vasc Bras. 2003;2(4):318-28.

Frank C, Bayoumi I, Westendorp C. Approach to infected skin ulcers. Can Fam Physician. 2005;51:1352-59.

Furtado KAX. Úlceras de perna: tratamento baseado em evidência. Nursing Portuguesa. 2003;80:36-45.

Gardner SE, Frantz RA, Saltzman CL, Dodgson KJ. *Staphylococcus aureus* is associated with high microbial load in chronic wounds. Wounds. 2004;16(8): 251-57.

Gardner SE, Frantz RA, Doebbeling BN. The validity of the clinical signs and symptoms used to identify localized chronic wound infection. Wound Rep Regen. 2001;9:178-86.

Gardner SE, Frantz RA, Park H, Scherubel M. The inter-rater reliability of the clinical signs and symptoms checklist and diabetic foot ulcers. Ostomy Wound Manage. 2007;53(1):46-51.

Gomes FSL, Carvalho DV, Lima EDRP. Tratamento de feridas crônicas com coberturas oclusivas. Reme: Rev. Min. Enferm. 2009;13(1):19-27.

Grey JE, Enoch S, Harding KG. Venous and arterial leg ulcers. BMJ 2006; 11(323):347-350.

GjØdsbøl K, Skindersoe ME, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Jensen AM, et al. No need for biopsies: comparison of three sample techniques for wound microbiota determination. Int Wound J. 2011;9.

Guimarães Barbosa JAG, Nogueira Campos LM. Diretrizes para o tratamento da úlcera venosa. Enferm Glob. [online] 2010;20.

Harding KG, Morris HL, Patel GK. Scienc, medicine and future: healing chronic wounds. BMJ. 2002;324:160-3.

Herber OR, Schnepf W, Rieger MA. A systematic review on the impact of leg ulceration on patients' quality of life. Health Qual Life Outcomes. 2007;5:44.

Hélène Garrec et al. Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Production by *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2011;49(3): 1048–57.

Hernandez R. The use of systemic antibiotics in the treatment of chronic wounds. Dermatol therapy. 2006;19(9):326-37.

Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hil KE, et al. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. J Antimicrobial Chemother. 2005;55(2):143-9.

Howell-Jones RS, Price PE, Howard AJ, Thomas DW. Antibiotic prescribing for chronic skin wounds in primary care. Wound Repair Regen. 2006;14(4):387-93.

Høgsberg T, Bjørnsholt T, Thomsen JS, Kirketerp-Møller K. Success rate of split-thickness skin grafting of chronic venous leg ulcers depends on the presence of *Pseudomonas aeruginosa*: a retrospective study. PLoS ONE. 2011; 6(5).

Jawetz, Melnick, Adberg: microbiologia médica: um livro médico. 24<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda; 2009.

Jarlier VMH et al.. Extended broad-spectrum 3-lactamases conferring transferrable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev. Infect. Dis. 1988(10):867-878.

Jones GS, Edwards R, Thomas DW. Inflammation and wounds healing: the role of bacteria in the immuno-regulation of wound healing. Lower Extremity Wounds. 2004;3(4):201-208.

Jorge SA, Dantas SRPE. Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas. São Paulo (SP): Atheneu; 2003.

Gangoue J et al. Extended-Spectrum--Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Yaounde, Cameroon. J. Clin. Microbiol. 2005, 43(7):3273.

Kanamori H, Yano H, Hirakata Y, Endo S, Arai K, Ogawa M, et al. High prevalence of extended-spectrum {beta}-lactamases and qnr determinants in *Citrobacter* species from Japan: dissemination of CTX-M-2. J Antimicrob Chemother. 2011;66(10):2255-62.

Kingsley A. A proactive approach to wound infection. Nurs Stand. 2001;15(30):50-4, 56, 58.

Kingsley A. The wound infection continuum and its application to clinical practice. Ostomy Wound Manage. 2003;49(7A Suppl):1-7.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Júnior WC. Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Landis SJ. Chronic Wound Infection and Antimicrobial Use. *Adv Skin Wound Care*. 2008;21:531-40.

Leão LSNO, Lima ABM, Costa DM, Vilefort LOR, Santos AAO, Gonçalves AOP, et al. Avaliação fenotípica de resistência em enterobactérias isoladas de profissionais de uma instituição para tratamento oncológico. *Braz J Infect Dis*. 2011;15(Suppl 1):163

Levin ASS, Arruda EAG, Oliveira MS. Infecções por *Pseudomonas*. In: Veronesi: tratado de infectologia. Editor científico: Roberto Focaccia. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 971-81.

Levine NS, Lindberg RB, Mason AD, Pruitt BA Jr. The quantitative swab culture and smear: a quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wound. *J Trauma*, 1976;16(2):89-94.

Lima ALLM, Oliveira PRD. Recomendações para o manejo das infecções em úlceras neuropáticas das extremidades inferiores. São Paulo: Bevilacqua editora; 2011.

Lopes HV, Antibióticos e antibioticoterapia. In: Veronesi: tratado de infectologia. Editor científico: Roberto Focaccia. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 31-45.

Macêdo EAB, Oliveira AKA, Melo GSM, Nóbrega WG, Costa IKF, Dantas DV, et al. Characterization sócio-demographic of patients with venous ulcers treated at a University Hospital. *Rev enferm UFPE on line*. [Internet] 2010;4(spe):1863-7. Available from: <http://www.ufpe.br/revistaenfermagem/index.php/revista/article/view/1475>.

Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP. Microbiologia de Brock. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

Maffei FHA. Insuficiência venosa crônica: conceito, prevalência etiopatogênica e fisiopatologia. In: MAFFEI F.H.A. et al. Doenças vasculares periféricas. 2 volumes. 3ª ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2002. p.1581-1590.

Maffei FHA, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HA, Giannini M, Moura R. Doenças vasculares periféricas, 2 volumes. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Magalhães V, Lins AK, Magalhães M. Metallo-Beta-Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. Braz J Microbiol. 2005;36(2):123-5.

Makdisse M. Índice Tornozelo-Braquial: importância e uso na prática clínica. São Paulo: Segmento Farma; 2004.70p.

Makdisse M, Ramos LR, Moreira F, Oliveira A, Berwanger O, Moscardi A, et al. A risk score for predicting peripheral arterial disease in individuals 75 years or older. Arq Bras Cardiol. 2007;88(6):630-6.

Martins MA. Avaliação de feridas crônicas em pacientes atendidos em unidades básicas de saúde de Goiânia [dissertação]. Goiânia: universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem; 2008. 143 p.

Martins MA, Tipple AFV, Reis C, Santiago SB, Bachion MM. Úlcera crônica de perna de pacientes em tratamento ambulatorial: análise microbiológica e de suscetibilidade antimicrobiana. Ciênc. Cuid. Saúde. 2010;9(3):464-70.

Martins DA, Souza AM. O perfil dos clientes portadores de úlcera varicosa cadastrados em Programas de saúde pública. Cogitare Enferm. 2007;12(3):353-7.

Melo GB, Barbaresco LF, Gontijo Filho PP. Fatores de risco e evolução de pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) por *Pseudomonas aeruginosa* em uma unidade de terapia intensiva (UTI): um estudo prospectivo. Braz J Infect Dis. 2011;15(Suppl 1):97.

Menke NB, Ward KR, Witten TM, Bonchev DG, Diegelmann RF. Impaired wound healing. Clin Dermatol. 2007;25(1):19-25.



Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. Comissão Nacional de Ética – CONEPE. Resolução n. 196/196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos. Brasília (Brasil): Ministério da Saúde, 1996.

Ministério do trabalho e emprego (MTE). Norma Regulamentadora nº 32; Portaria n.º 485, de 11 de novembro de 2005 – Segurança e saúde no trabalho em serviços de saúde. Brasília (Brasil): Ministério do Trabalho e Emprego, 2005.

Moreira MR, Rocha LA, Guimarães MP, Barbaresco LF, Melo GB, Gontijo Filho PP. Uso de antimicrobianos, etiologia e perfil de resistência aos antimicrobianos de bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) responsáveis por pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVs) em unidade de terapia intensiva de um hospital universitário brasileiro. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(Supl 1):171.

Mortari AP, Saucedo EM, Pereira RS, Duarte M, Vizzotto BS, Santos RCV. Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* produtoras de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC em isolados clínicos de Santa Maria – RS. *Rev. bras. anal. clín.* 2008;40(2):147-9.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia médica. 5ª ed. Rio de Janeiro(RJ): Elsevier; 2006.

NCCLS - National Commitee For Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. Pennsylvania: NCCLS; 2003.

Nunes JP. Avaliação da assistência à saúde dos portadores de úlceras venosas atendidos no programa saúde da família do município de Natal/RN [dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde; 2006. 131 p.

O’Meara S, AL-Kurdi D, Ovington LG. Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;23(1).

Oplustil CP, Zocolli CM, Tobouti NR, Sinto SI. Procedimentos básicos em microbiologia clínica. 2.<sup>a</sup> ed. São Paulo: Sarvier; 2004.

Ovington L. Bacterial Toxins and wound healing. *Ostomy Wound Manage.* 2003;49(7A):8-12.

Pereira AL. Revisão sistemática da literatura sobre produtos usados no tratamento de feridas [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem; 2006. 129 p.

Pinto IC, Passeri IAG, Silva DS, Oliveira MM. (Re)organizando a sala de curativo do Dentro de Saúde Escola da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. *Acta Paul Enferm.* 2005;18(1):89-93.

Quege GH. Estudo comparativo do uso de um produto à base de ácidos graxos essenciais (AGE) e de uma biomembrana de látex no tratamento de feridas crônicas infectadas em pacientes curados de hanseníase [dissertação] Goiânia: universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem; 2008. 235 p.

Raffetto, J.D. Dermal pathology, cellular biology, and inflamamation in chronic venous disease. *Thrombosis research.* 2009;(Suppl 4):S66-S71.

Reichenberg J, Davis M. Venous Ulcers. *Semin Cutan Med Surg.* 2005;24:216-26.

Robson MC, Cooper DM, Aslam R, Gould LJ, Harding KG, Morgolis DJ, et. al. Guidelines for the treatment of venous ulcers. *Wound Rep Reg.* 2006;14:649-62.

Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *CID.* 2011;52:1138-43.

Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo: Editora Atheneu; 2005.

Sader HS. Resistência bacteriana a antimicrobianos. In: Veronesi: tratado de infectologia. Editor científico: Roberto Focaccia. 3ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2005. p. 89-107.

Salgado FXC, Oliveira SLT, Silva NB, Souza CM, Gonçalves JC, Calderaro J, et al. Avaliação da prevalência de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em uma unidade de terapia intensiva. Braz J Infect Dis. 2011;15(Suppl 1):86.

Sant'ana SMSC. Úlceras venosas: caracterização e tratamento em usuários atendidos nas salas de curativos da rede municipal de saúde de Goiânia – GO [dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Enfermagem; 2011.165 p.

Santos AAR, Medeiros ABA, Soares MJGO, Costa MML. Avaliação e tratamento de feridas: o conhecimento de acadêmicos de enfermagem. Rev enferm UERJ. 2010;18(4):547-52.

Santos RP, Nascimento CA, Andrade EN. Uso da eletroestimulação de alta voltagem na cicatrização de úlceras venosas. Fisioter Mov. 2009;22(4):615-23.

Santos VP, Silveira DR, Caffaro RA. Risk factors for primary major amputation in diabetic patients. São Paulo Med J. 2006;124(2):66-70.

Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Ayello EA, Dowsett C, Harding K, et al. Wound bed preparation: a systematic approach to wound management. Wound Repair Regen. 2003;11(Suppl 1):S1-28.

Segheto L, Araújo ALA. Morbimortalidade associada à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes internados na UTI de um hospital universitário. Braz J Infect Dis. 2011;15 (Suppl 1):107.

Sieggreen, M. Lower extremity arterial and venous ulcers. Nurs Clin N Am. 2005;40:391-410.

Silva MC. Insuficiência venosa crônica: diagnóstico e tratamento. In: Maffei FHA, Lastória S, Yoshida WB, Rollo HÁ, Giannini M, Moura R. Doenças

vasculares periféricas. 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008: p.1804-14.

Tavares W. - Manual de Antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3<sup>a</sup> ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2002.

Trabulsi L, Alterthum F. Microbiologia. 5<sup>a</sup> Edição. São Paulo: Editora Atheneu; 2008.

Torres JCN, Menezes EA, Ângelo MRF, Oliveira IRN, Salviano MNC, Xavier DE, et al. Cepas de *Pseudomonas* spp. produtoras de metalo-betalactamase isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. J Bras Patol Med Lab. 2006;42(5):313-9.

Vasques MRG, Bello AR, Lamas CC, Correa J, Pereira JAA. B-lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in cardiac intensive care unit in Rio de Janeiro, Brazil. Braz J Infect Dis. 2011;15(1):28-33.

Vera LA, Macedo JLS, Ciuffo IA; Santos CG; Santos JB. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbicas isoladas de úlceras leishmanióticas, em Corte de Pedra, BA. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2006;39(1):47-50.

Vicentim AL, Gatti MAN, Weckwerth PH, Carvalho RCO. Etiologia da microbiota presente em úlceras venosas de usuários de bota de unha. Salusvita. 2009; 28(1):65-72.

Villas Bôas PJF, Ruiz T. Ocorrência de infecção hospitalar em idosos internados em hospital universitário. Rev Saúde Pública. 2004;38(3):372-8.

Villegas MV, Blanco MG, Sifuenes-Osornio J, Rossi F. Increasing prevalence of extended-spectrum-beta-lactamase among Gram-negative bacilli in Latin America – 2008 update from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). Braz J Infect Dis. 2011;15(1):34-9.

White RJ, Cutting KF. Critical colonization – the concept under scrutiny. *Ostomy Wound Manage*. 2006;52(11):50-6.

Wolcott RD, Gontcharova V, Sun Y, Dowd SE. Evaluation of the bacterial diversity among and within individual venous leg ulcers using bacterial tag-encoded FLX and Titanium amplicon pyrosequencing and metagenomic approaches. *BMC Microbiol*. 2009;9:226.

Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini GM, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- $\beta$ lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(10):3798-801.