

IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES BACTERIANAS EM UMA FERIDA CRÔNICA DE UM PACIENTE IDOSO INSTITUCIONALIZADO – ESTUDO DE CASO

Alex Hunter Castro¹
Vítor Scotta Hentschke²
Laisa Xavier Schuh³
Celso Afonso Klein-Júnior⁴
Guilherme Scotta Hentschke⁵

RESUMO

OBJETIVOS: Identificar os microrganismos presentes em uma ferida crônica de lesão por pressão de um idoso institucionalizado, bem como avaliar a resistência a antibióticos das linhagens identificadas. **MATERIAIS E MÉTODOS:** As coletas foram realizadas com *swab*, e as linhagens foram isoladas nos meios de cultura Macconkey e Sangue com posterior análise bioquímica e identificação. Para o antibiograma foi utilizado o método de disco-difusão com os antibióticos: amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, penicilina, oxacilina e ciprofloxacino. **RESULTADOS:** Foram isoladas uma linhagem do gênero de *Proteus* Hauser (*Enterobacteriaceae*), uma linhagem de *Pseudomonas* Migula (*Pseudomonadaceae*) e uma linhagem de *Streptococcus* Rosenbach (*Streptococcaceae*) classificado como β hemolítico. *Proteus vulgaris* se mostrou resistente a: amoxicilina + clavulonato de potássio e ampicilina. *Streptococcus* foi resistente a: penicilina G e oxacilina. *Pseudomonas* sp não teve crescimento significativo. A ferida apresentou infecção por duas linhagens resistentes de bactérias (*P. vulgaris* e *Streptococcus* sp.) e uma não resistente (*Pseudomonas* sp.). Essas linhagens podem contribuir para a não cicatrização da ferida. **CONCLUSÕES:** A identificação correta das bactérias presentes em feridas e o conhecimento sobre as respectivas capacidades de resistência a antibióticos são de suma importância no tratamento de idosos institucionalizados.

Palavras-chave: bactérias anaeróbias, infecções bacterianas, Enterobacteriaceae.

ABSTRACT

AIMS: To identify the microorganisms present in a chronic pressure injury wound of an institutionalized elderly, as well as to evaluate the antibiotic resistance of the identified strains. **MATERIALS AND METHODS:** The samples were collected with swabs and the lines were isolated in the Macconkey and Blood culture media with subsequent biochemical analysis

¹ Acadêmico do Curso de Enfermagem/ULBRA – Campus Cachoeira do Sul.

² Professor do Curso de Fisioterapia/ULBRA – Campus Cachoeira do Sul.

³ Professora do Curso de Enfermagem/ULBRA – Campus Cachoeira do Sul.

⁴ Professor do Curso de Odontologia/ULBRA – Campus Cachoeira do Sul.

⁵ Biólogo e Pós-doutorando do Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research. (CIIMAR), Av. General Norton de Matos, 4450-208, Matosinhos, Portugal.

and identification. For the antibiogram the disc-diffusion method was used with antibiotics: amoxicillin + clavulanic acid, ampicillin, penicillin, oxacillin and ciprofloxacin. **RESULTS:** A strain of the genus *Proteus* Hauser (*Enterobacteriaceae*), a strain of *Pseudomonas* Migula (*Pseudomonadaceae*) and a strain of *Streptococcus* Rosenbach (*Streptococcaceae*) classified as β hemolytic was isolated. *Proteus vulgaris* was resistant to: amoxicillin + potassium clavulonate and ampicillin. *Streptococcus* resistant to: penicillin g and oxacillin. *Pseudomonas sp* did not show significant growth. The wound presented infection by two resistant strains of bacteria (*P. vulgaris*, *Streptococcus sp*) and one non-resistant *Pseudomonas sp*. These strains may contribute to non-healing of the wound. **CONCLUSION:** The correct identification of bacteria present in wounds and knowledge about their antibiotic resistance abilities are important in the treatment of institutionalized elderly.

Key-words: bacteria, Anaerobic, bacterial Infections, Enterobacteriaceae.

INTRODUÇÃO

Lesões por pressão são causadas primariamente por pressões não aliviadas principalmente em proeminências ósseas e aproximadamente 70% das lesões ocorrem na população geriátrica (GIST *et al.*, 2009). As lesões por pressão em idosos podem causar morbidade e mortalidade significativas e representam um grande ônus econômico para o sistema de saúde (BOWLER *et al.*, 2001). Além disso, as frequentes consultas para troca de curativos ou internações desses pacientes oneram o sistema público de saúde e oferecem risco de infecções a outros pacientes.

A incidência de lesões crônicas relacionadas com Diabetes Mellitus, doença vascular periférica e problemas de mobilidade ocorre com frequência crescente na população geriátrica (GIST *et al.*, 2009). A pele intacta desempenha um papel importante no controle da microbiota na superfície da pele e impede que o tecido subjacente seja colonizado e invadido por potenciais patógenos (WONG *et al.*, 2013). Ferimentos proporcionam um ambiente favorável à colonização e proliferação microbiana e, nesse contexto, as feridas crônicas são uma importante porta de entrada dessas infecções que, quando não tratadas, dificultam a cicatrização, agravam o estado de saúde de pacientes idosos, e podem desencadear quadros de septicemia grave ou morte (KONEMAN *et al.*, 2001).

Bactérias desempenham um importante papel na patogênese das feridas crônicas e, frequentemente, a cronificação das lesões é relacionada ao aumento da carga bacteriana no local da lesão, aumentando o tempo de cicatrização (HOWELL-JONES *et al.*, 2005; SIDDIQUI & BERNSTEIN, 2010; MATTERA *et al.*, 2014). O uso de antibióticos é comum na prática clínica para o tratamento de feridas crônicas, porém a resistência aos antibióticos se desenvolve como uma natural consequência da habilidade da população bacteriana de se adaptar (SANTOS, 2004). O impacto das bactérias-resistentes, e o uso indiscriminado de antibióticos no meio hospitalar é um problema mundial que vem preocupando o meio científico (SANTOS, 2004; BASSETTI *et al.*, 2019).

Para combater a emergente propagação de bactérias resistentes aos antimicrobianos e o desenvolvimento de novos mecanismos de resistência é necessário que se tenha uma abordagem conjunta de segmentos governamentais, da sociedade, além da necessidade de políticas que resultem em investimento em pesquisas, na aquisição de tecnologias e

no desenvolvimento de recursos humanos (ANVISA, 2017). A análise da presença e a identificação específica de microrganismos em feridas crônicas, apesar de não ser de hábito comum, são de suma importância para diagnósticos e tratamentos, diminuindo o número de internações, melhorando a qualidade de vida da população e também evitando mortes (SILVA & NEUFELD, 2006).

Dessa forma, o objetivo do estudo é identificar os microrganismos presentes em uma ferida crônica de lesão por pressão de um idoso institucionalizado, bem como avaliar a resistência a antibióticos das linhagens identificadas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Participante da Pesquisa

Idosa (74 anos) do sexo feminino, residente em uma instituição de longa permanência para idosos (ILPS) na cidade de Cachoeira do Sul/RS, portadora de uma ferida crônica na região sacral não cicatrizada há 7 anos sendo tratada, até o momento da coleta, com solução fisiológica e óleo cicatrizante de girassol. A participante é acamada devido à paraplegia e não apresenta outras doenças crônicas prévias, de acordo com os prontuários da instituição.

Coleta e Análise das Amostras

Coleta das Amostras: Foram coletadas duas amostras da superfície da ferida utilizando-se *swabs* estéreis. Após a coleta, o *swabs* foram colocados em frascos separados, vedados, contendo solução salina estéril (6,5%), e imediatamente levados ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Luterana do Brasil – ULBRA Cachoeira do Sul/RS. Para posterior semeadura em meios de cultura, as amostras foram mantidas em estufa $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, durante 24 horas (KONEMAN *et al.*, 2001).

Semeadura: Após esse período, com utilização de alça bacteriológica, para cada amostra foi realizado o seguinte procedimento: para isolar bactérias Gram positivas uma alíquota foi semeada em uma placa de Petri com meio de cultura Ágar Sangue sólido (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Mumbai, Índia), e para isolar bactérias Gram negativas, uma alíquota foi inoculada em uma placa com meio Ágar MacConkey sólido (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd, Mumbai, Índia), totalizando quatro placas, que foram incubadas em estufa a $36\pm 1^{\circ}\text{C}$, por um período de 24 horas (KONEMAN *et al.*, 2001).

Isolamento de linhagens: Os aspectos morfológicos como forma, elevação e bordas das colônias bacterianas resultantes foram comparados e para o isolamento de linhagens, foram selecionadas duas colônias de cada aspecto encontrado. As colônias selecionadas foram repicadas 3 vezes, nos mesmos meios de cultura, até a obtenção de linhagens isoladas. Após isso, as linhagens isoladas foram inoculadas em meios de

cultura sólidos inclinado para armazenamento e posterior identificação bioquímica (ANVISA, 2013).

Análise Bioquímica de Bactérias: As colônias isoladas em Ágar MacConkey e caracterizadas como bacilos Gram-negativos (BRASIL., 1997), foram submetidas aos seguintes testes: produção de indol, motilidade, produção de sulfeto de hidrogênio, vermelho de metila, utilização do citrato, descarboxilação da fenilalanina desaminase e fermentação de açúcares (glicose, lactose e sacarose). As reações bioquímicas foram realizadas em tubos de ensaio incubados em estufa a $36\pm 1^\circ\text{C}$ de 24 horas (KONEMAN *et al.*, 2001). As colônias em meio Ágar Sangue, caracterizadas como cocos Gram-positivos, foram submetidas aos testes de urease, catalase e reativo de Kovacs (ANVISA, 2013).

Antibiograma: Os bacilos Gram-negativos e os cocos Gram-positivos identificados foram submetidos ao teste de disco-difusão seguindo as recomendações do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* para a determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos: amoxicilina + ácido clavulânico, ampicilina, penicilina e oxacilina. Os antibióticos foram escolhidos de acordo com manual (LABORCLIN, 2011).

O aspecto das colônias, os resultados de coloração de Gram, testes bioquímicos e antibiograma foram descritos em tabelas comparativas para identificação de linhagens. As linhagens foram identificadas de acordo com (KONEMAN *et al.*, 2001; SILVA & NEUFELD, 2006; ANVISA, 2008; ANVISA, 2013).

Aspectos éticos

Este estudo seguiu os princípios éticos da Resolução N° 466 de 12 de dezembro de 2012 e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas em Seres Humanos (CEP) da Universidade Luterana do Brasil, sob o número CAAE 96759318.6.0000.5349, tendo o número de parecer substanciado 2.971.636.

RESULTADOS

Identificação das linhagens

A partir das amostras coletadas foram isoladas três linhagens de bactérias. Em meio de cultura Ágar Macconkey foi isolada uma linhagem do gênero *Proteus* Hauser 1885 (*Enterobacteriaceae*) e uma linhagem de *Pseudomonas* Migula 1984 (*Pseudomonadaceae*). A linhagem do gênero *Proteus* foi identificada como *P. vulgaris* Hauser, de acordo com os testes H_2S (gás sulfídrico) positivo, fenilalanina positivo e indol positivo. Em meio de cultura Ágar Sangue foi isolada uma linhagem de *Streptococcus* Rosenbach 1884 (*Streptococcaceae*) classificado como β hemolítico (Tabela 1). A diferenciação entre os estreptococos e os estafilococos se deu pela prova da catalase (Tabela 1).

Tabela 1 – Características das linhagens isoladas.

	<i>Streptococcus β H</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Pseudomonas sp</i>
Gram	Positiva	Negativa	Negativa
Morfologia da célula	Cocos	Bacilos	Bacilos
Lactose	Negativo	Negativo	Negativo
Citrato	NSA	Negativo	Positivo
Fenilalanina	NSA	Positivo	Negativo
Tsi	NSA	Positivo	Negativo
Lisina	NSA	Negativo	Negativo
Sim	NSA	Positivo	Positivo
Indol	NSA	Positivo	Positivo
Catalase	Negativo	NSA	NSA
Hemólise	Positivo	Negativo	Negativo
Oxidase	NSA	NSA	Positivo

Antibiograma

A linhagem *P. vulgaris* se mostrou resistente a: amoxicilina + clavulonato de potássio e ampicilina. *Streptococcus* foi resistente a: penicilina G e oxacilina. *Pseudomonas* sp não teve crescimento significativo na placa de testes de antibiograma (Tabela 2).

Tabela 2 – Antibiograma das linhagens.

Linhagem	Antibiótico	Diâmetro do halo	Classificação
<i>Proteus vulgaris</i>	amox+clav	27 mm	Resistente
	ampicilina	22 mm	Resistente
<i>Streptococcus</i> sp.	penicilina	27 mm	Resistente
	oxacilina	18 mm	Resistente

DISCUSSÃO

A ferida estudada apresentou infecção por duas linhagens resistentes de bactérias (*P. vulgaris* e *Streptococcus* sp.) e uma não resistente (*Pseudomonas* sp.). Essas linhagens podem contribuir para a não cicatrização da ferida.

A presença das enterobactérias pode ser explicada devido à lesão do paciente ser em um local com proximidade a fezes e urina. As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram-negativos de importância clínica e são patógenos oportunistas para o homem, causando doenças em indivíduos imunodeprimidos como infecções em feridas, sendo responsáveis por cerca de 50% das septicemias (ANVISA, 2013).

Dentre as linhagens isoladas, destaca-se a presença de *Pseudomonas* sp., que é um bacilo não fermentador de glicose e que pode ser responsável por cerca de 80% das infecções relacionadas a bactérias Gram-negativas, além de ser a maior ameaça para pacientes hospitalizados e estar relacionado a uma alta taxa de mortalidade (SILVA & NEUFELD, 2006). As bactérias gram-positivas, já foram as maiores causadoras

de infecção relacionada à assistência à saúde na era pré-antibiótica, causando surtos de infecção e mortes. Ainda, nos dias atuais, provocam doenças graves e letais, sendo importante o rápido diagnóstico (ANVISA, 2013). O aumento de culturas de vigilância e a precoce detecção de isolados multirresistentes poderão contribuir para um maior controle epidemiológico, evitando a instauração de surtos, sendo que os múltiplos mecanismos de resistência de *Pseudomonas* parece ser um evento favorável para a seleção de diferentes clones endêmicos multirresistentes disseminados no Brasil (NEVES *et al.*, 2011).

Todas as feridas contêm algumas bactérias. A questão é saber se a quantidade de bactérias representa apenas a colonização da ferida ou representa supercrescimento bacteriano e infecção, sendo que este último pode levar a falha cicatrização de feridas (GIST *et al.*, 2009). Como os microrganismos de uma variedade de fontes apresentam uma oportunidade de colonizar um habitat comum, as interações microbianas exclusivas desse ambiente específico podem influenciar significativamente a patogênese e a cicatrização da ferida (BOWLER *et al.*, 2001). Enfatizamos que, apesar dos cuidados que a participante tem sido submetida e o não diagnóstico de doenças crônicas, os resultados demonstraram a presença de bactérias causadoras de doenças e resistentes a antibióticos. Desse modo, destaca-se a importância da correta identificação e do conhecimento sobre a resistência dessas bactérias a antibióticos. Tal prática, raramente é executada rotineiramente em ILPS, hospitais ou na saúde pública no Brasil, acarretando no aumento da resistência bacteriana a antibióticos comumente utilizados e consequentemente gerando maiores gastos para os pacientes e para o governo.

Destaca-se também que, o preparo dos profissionais para realização de tal processo é essencial e os cuidados com feridas crônicas devem ser realizados por uma equipe multidisciplinar capacitada. Alguns aspectos como estado nutricional, funcionalidade motora, idade do paciente, mudanças de decúbito, bem como a análise de amostras de feridas são necessários para um diagnóstico rápido e um prognóstico completo.

CONCLUSÃO

A identificação correta das bactérias presentes em feridas e o conhecimento sobre as respectivas capacidades de resistência a antibióticos são de suma importância no tratamento de idosos institucionalizados. Deve-se salientar, que para o tratamento de feridas crônicas, além da correta identificação das espécies de bactérias presentes, também é importante a análise do paciente como um todo, bem como o tipo da ferida, as questões relacionadas à higiene geral e perineal, e uma avaliação do seu estado nutricional.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Universidade Luterana do Brasil – Campus Cachoeira do Sul pela disponibilização dos laboratórios e dos materiais necessários para a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. **Módulo 4: Gram-Positivos**, Brasília, 2008.
- ANVISA. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 4 : Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final**, Brasília, 2013
- ANVISA. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**, Brasília, 2017.
- BASSETTI, M., *et al.* Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. **Front Med (Lausanne)**, v.6, p.74, 2019.
- BOWLER, P. G., *et al.* Wound microbiology and associated approaches to wound management. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.2, p.244-69. Apr, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Técnica de Coloração de Gram. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis e AIDS**, Brasília, 1997.
- GIST, S., *et al.* Wound care in the geriatric client. **Clin Interv Aging**, v.4, p.269-87, 2009.
- HOWELL-JONES, R. S., *et al.* A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. **J Antimicrob Chemother**, v.55, n.2, p.143-9. Feb, 2005.
- KONEMAN, E. W., *et al.* **Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido**. Editora Médica e Científica Ltda, v.5ª edição. 2001
- LABORCLIN, L. Manual para ANTIBIOGRAMA Difusão em Disco ((Kirby & Bauer). Rev.: 05/04/2011. Disponível em: http://www.interlabdist.com.br/dados/noticias/pdf_190.pdf. 2019.
- MATTERA, E., *et al.* Assessment of bacterial infection in chronic wounds in the elderly: biopsy versus VERSAJET. **Int J Surg**, v.12 Suppl 2, p.S50-S55, 2014.
- NEVES, P. R., *et al.* Pseudomonas aeruginosa multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **J Bras Patol Med Lab**, v.47, n.4, p.409-420, 2011.
- SANTOS, N. D. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v.13, p.64-70, 2004.
- SIDDIQUI, A. R. & J. M. BERNSTEIN. Chronic wound infection: facts and controversies. **Clin Dermatol**, v.28, n.5, p.519-26. Sep-Oct, 2010.
- SILVA, C. H. P. M. & P. M. NEUFELD. **Bacteriologia e Micologia**. Rio de Janeiro: Editor Revinter. 2006
- WONG, S., *et al.* Analysis of bacterial diversity in healing and non-healing wounds among Malaysian subjects by phenotypic identification and 16S rDNA sequencing. **Biomedical Research**, v.24, n.3, p.389-395, 2013.