

Resistência bacteriana associada as feridas crônicas em pacientes adultos

Bacterial resistance associated with chronic wounds in adult patients

Resistencia bacteriana asociada a heridas crónicas en pacientes adultos

Recebido: 02/05/2023 | Revisado: 15/05/2023 | Aceitado: 17/05/2023 | Publicado: 22/05/2023

Bruna Jéssica Dantas de Lucena

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0526-3347>
Universidade Federal do Semi-Árido, Brasil
E-mail: brunalucena@outlook.com.br

Sarah Vitória Gomes de Sousa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3830-9209>
Universidade Potiguar, Brasil
E-mail: sv453141@gmail.com

Layne Simone Silva de Araújo

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-4956-9948>
Universidade Federal do Semi-Árido, Brasil
E-mail: lainebio2016@gmail.com

Ana Beatriz Soares de Andrade

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-6673-5093>
Universidade Potiguar, Brasil
E-mail: anabeatrizsoares2528@gmail.com

Lara Barbosa de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4730-1401>
Universidade Potiguar, Brasil
E-mail: larabiotec@gmail.com

Resumo

O número de pacientes portadores de feridas crônicas na comunidade adulta é crescente. A presença dessas lesões impacta de forma negativa o estilo de vida e bem-estar do paciente, devido ao incomodo e dor que dificultam ou inibem de forma total a realização de atividades cotidianas antes realizadas pelos pacientes. Neste cenário o estudo teve por objetivo realizar a caracterização dos gêneros microbianos relacionados aos processos infecciosos das feridas, dando enfoque principal a análise da resistência antimicrobiana. A pesquisa utilizou a análise qualitativa, sendo composta por três análises, divididas em coleta microbiológica, inoculação em meio nutritivo, coloração de Gram, inoculação em meios seletivos e diferenciais, provas bioquímicas e antibiograma. A análise qualitativa dos testes e resultados indicaram a presença de *Pseudomonas spp* e *Staphylococcus aureus*. O teste de susceptibilidade microbiana demonstrou alto índice de resistência aos antimicrobianos testados, no qual os isolados analisados demonstraram uma resistência aumentada a penicilina. A persistência da lesão e colonização bacteriana torna-se preocupante pelo aumento do tempo de tratamento e alta susceptibilidade, além do agravamento do quadro clínico e microbiológico do paciente.

Palavras-chave: Staphylococcus; Pseudomonas; Penicilina.

Abstract

The number of patients with chronic wounds in the adult community is growing. The presence of these lesions negatively impacts the patient's lifestyle and well-being, due to the discomfort and pain that make it difficult or completely inhibit the performance of daily activities previously performed by patients. In this scenario, the study aimed to characterize the microbial genera related to the infectious processes of wounds, focusing mainly on the analysis of antimicrobial resistance. The research used qualitative analysis, consisting of three analyses, divided into microbiological collection, inoculation in nutritive medium, Gram stain, inoculation in selective and differential means, biochemical tests and antibiogram. Qualitative analysis of tests and results indicated the presence of *Pseudomonas spp* and *Staphylococcus aureus*. The microbial susceptibility test showed a high level of resistance to the tested antimicrobials, in which the analyzed isolates showed an increased resistance to penicillin. The persistence of the lesion and bacterial colonization becomes worrying due to the increase in treatment time and high susceptibility, in addition to the worsening of the clinical and microbiological condition of the patient.

Keywords: Resistance; Wounds; Antibiotic.

Resumen

El número de pacientes con heridas crónicas en la comunidad adulta está creciendo. La presencia de estas lesiones impacta negativamente en el estilo de vida y el bienestar del paciente, debido a las molestias y dolores que dificultan o inhiben por completo la realización de las actividades diarias que antes realizaban los pacientes. En ese escenario, el

estudio tuvo como objetivo caracterizar los géneros microbianos relacionados con los procesos infecciosos de las heridas, centrándose principalmente en el análisis de la resistencia antimicrobiana. La investigación utilizó el análisis cualitativo, compuesto por tres análisis, divididos en colecta microbiológica, inoculación en medio nutritivo, tinción de Gram, inoculación en medios selectivos y diferenciales, pruebas bioquímicas y antibiograma. El análisis cualitativo de las pruebas y resultados indicó la presencia de *Pseudomonas* spp y *Staphylococcus aureus*. La prueba de susceptibilidad microbiana mostró un alto nivel de resistencia a los antimicrobianos probados, en el que los aislados analizados mostraron una mayor resistencia a la penicilina. La persistencia de la lesión y la colonización bacteriana se vuelve preocupante por el aumento del tiempo de tratamiento y la alta susceptibilidad, además del empeoramiento del estado clínico y microbiológico del paciente.

Palabras clave: Resistencia; Heridas; Antibiótico.

1. Introdução

As feridas crônicas são classificadas como lesões que não progredem para a cicatrização seguindo uma sequência ordenada de reparo. Entre essas lesões podemos classificar as úlceras venosas, por pressão e diabéticas. Durante a avaliação desses pacientes deve-se relatar a localização da ferida, profundidade, tamanho, aspecto epitelial, tipo de tecido atingido, drenagem e outros critérios essenciais para o acompanhamento clínico. Entretanto, pacientes portadores de feridas crônicas estão em constante perigo devido aos riscos de infecções e colonização bacteriana (Bowers & Franco, 2020)

Os aspectos que contribuem para um quadro crônico grave resultam de aspectos inflamatórios e fisiológicos, tais como: circulação sanguínea; queda de colágeno; doenças que prejudicam o processo de cicatrização; como diabetes (Buch *et al.*, 2020). Contudo, um dos principais fatores é relacionado a produção de toxinas bacterianas no local, provocando uma maior degradação do colágeno e estresse tecidual, prejudicando o processo de cicatrização normal (Versey *et al.*, 2021). A colonização polimicrobiana provoca uma alta heterogeneidade, dificultando a cura total. A formação de biofilmes favorece a multiplicação das populações bacterianas e a resistência antimicrobiana (Goldberg & Diegelmann, 2020).

Segundo uma análise, foi observado que as feridas crônicas têm uma alta relação com a microbiota da pele, idade, doenças subjacentes, estado imunológico do paciente, estado nutricional e estresse, fatores esses que podem contribuir para uma falha no processo de cicatrização. A taxa de mortalidade e morbidade devido as feridas crônicas são crescentes, segundo pesquisas aproximadamente 55% da população é atingida por úlceras nos EUA. No Brasil, estima-se que aproximadamente 3% da população local são acometidas por úlcera de origem venosa, sendo que, em pacientes diabéticos esse número se eleva para 10% (Tomic-canic *et al.*, 2020)

O processo de cicatrização das lesões ocorre de forma organizada, sendo mantida pela ação das células devido aos fatores de crescimento. A cicatrização comumente é associada a milhares de células trabalhando arduamente, fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas. Quando ocorre a falha em um desses fatores a formação do novo tecido é prejudicada, e grande porta de entrada favorece os microrganismos da microbiota epitelial e externos, permitindo o acesso desses patógenos para áreas teciduais subjacentes. A lesão proporciona o ambiente perfeito para colonização e crescimento microbiano. A presença de microrganismos resistentes patogênicos representa uma dificuldade de cicatrização de feridas. É incontestável a necessidade da avaliação e análise microbiota da epiderme e sua relação com a dificuldade de cicatrização e cronificação (Tomic-canic *et al.*, 2020).

As feridas crônicas beneficiam a colonização de diversas espécies bacterianas aeróbias e anaeróbias, comumente encontradas em tecidos mais profundos da lesão (Vestby *et al.*, 2020). De acordo com análises realizadas em feridas, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* são usualmente identificadas em tecidos superficiais, onde o ambiente permanece aeróbico. Os patógenos que colonizam as feridas crônicas possuem a capacidade de escapar do sistema imunológico e resistir aos antimicrobianos, favorecendo a instalação recorrente de infecções agudas nos tecidos locais e subjacentes. As bactérias são microrganismos adaptáveis a diversos ambientes, mesmo em locais com pouca oferta de nutrientes. Essa capacidade de adaptação bacteriana proporciona a resistência antimicrobiana (Vestby *et al.*, 2020).

Contrariamente, nos tecidos mais profundos são observados geralmente outras espécies de *Bacteroides spp*; *Fusobacterium spp*; *Peptostreptococcus spp* e *Clostridium spp*. A constante colonização e formação de biofilme, induz a falha na cicatrização. Conforme pesquisa, até 60% das feridas crônicas analisadas através de biópsias e microscopias eletrônica, apresentavam biofilme. Essas análises indicam que a presença de uma comunidade bacteriana na lesão é capaz de provocar a falha o tratamento antimicrobiano e declínio do processo de cicatrização (Vestby *et al.*, 2020).

A ocorrência de feridas crônicas na comunidade adulta é crescente. Os pacientes portadores de lesões crônicas possuem limitações quanto a mobilidade e estilo de vida. Na Clínica Integrada da Universidade Potiguar – UnP, a presença constante de pacientes que possuem feridas recorrentes é preocupante. O incômodo e dor provocadas pela lesão, impossibilitam atividades cotidianas antes realizadas pelos pacientes, afetando o estado físico, emocional e mental.

Neste cenário o estudo teve por objetivo analisar a comunidade bacteriana associada a feridas crônicas de pacientes adultos cadastrados na Clínica Integrada da UNP-Mossoró, assim como realizar a caracterização dos gêneros microbianos relacionados aos processos infecciosos das feridas, dando enfoque principal a análise da resistência antimicrobiana.

2. Metodologia

O presente estudo apresentou caráter quantitativo e qualitativo, com característica observacional e analítica, com base na metodologia científica de Cristancho, S. M (2018), a coleta e análise microbiológica, tiveram base no estudo de Wong, S. Y (2015). A pesquisa foi conduzida na Clínica Integrada em Saúde da Universidade Potiguar – UnP localizada na cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte. Durante a realização da pesquisa coletou-se dados e amostras de participantes voluntários, recrutados na Clínica UNP, após conhecimento da pesquisa e assinatura do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) conforme registro da pesquisa na Plataforma Brasil e comitê de ética sob o número 58382122.5.0000.5296.

Os pacientes foram abordados no dia habitual de consulta ou agendamento. Onde o paciente teve a oportunidade de retirar dúvidas e decidir voluntariamente aceitar ou não ser incluso na pesquisa, o aceite foi firmado com o preenchimento do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Ao final do cadastramento, obteve-se um grupo de pacientes adultos/idosos, do sexo feminino e masculino que realizam o tratamento de curativos semanalmente da Clínica da Universidade Potiguar.

O cadastramento dos pacientes ocorreu através do preenchimento dos dados pessoais como nome, idade, comorbidade, sexo, número de telefone, dia de consulta, medicamentos, data de nascimento e grau da ferida.

2.1 Coleta e processamento

A primeira etapa após o cadastramento dos voluntários consistiu em realizar a coleta de material biológico na lesão crônica para análise microbiológica. Foi realizado o cadastramento de quatro pacientes, onde coletou-se o material no decorrer de três meses em intervalos de 15 dias. A coleta foi realizada nas dependências da Clínica Integrada em Saúde da UnP, campus Mossoró/RN. Foi realizada com auxílio de um swab umedecido com solução salina a 0,9%, na dimensão de 5cm². O local da coleta oscilou a depender do local da lesão, de acordo com a Tabela 1.

O voluntário A1 apresentava somente uma lesão na área Distal/dorsal esquerda. O voluntário da amostra A2, apresentava duas lesões, uma na área Distal/dorsal esquerda e outra na área Distal/dorsal Direita. De forma que na 1^o análise a lesão alvo foi a esquerda. O voluntário A3 possuía também uma única lesão na região Distal/dorsal esquerda, enquanto o voluntário A4 apresentava duas lesões, uma na região sagital podal direita e uma segunda lesão na área Distal/dorsal esquerda, de forma que a lesão localizada na sagital podal era de caráter inicial. E devido ao histórico de permanência e recaída constante do voluntário A4, foi dado ênfase em suas duas lesões. Totalizando a coleta de 5 amostras para análise microbiológica.

Tabela 1 - Amostras e áreas coletadas durante a 1^o coleta de material das feridas crônicas para análise microbiológica.

AMOSTRA	ÁREA(S)
A1	Lesão Esquerda
A2e	Lesão Esquerda
A3	Lesão Esquerda
A4d	Lesão Direita
A4e	Lesão Esquerda inicial

Legenda: A1 – amostra um; A2e – amostra dois (membro esquerdo); A3 – amostra três; A4d – amostra quatro (membro direito); A4e – amostra quatro (membro esquerdo). Fonte: Arquivo pessoal (2022).

Durante a 2^o coleta, o voluntário A2 recebeu enfoque em sua segunda lesão na Área Distal/dorsal direita, não inicial, conforme demonstrado na Tabela 2, favorecendo o controle das amostras.

Tabela 2 - Amostras e áreas coletadas durante a 2^o coleta de material das feridas crônicas para análise microbiológica, no Centro Clínico.

AMOSTRA	ÁREA(S)
A1	Lesão Esquerda
A2d	Lesão Direita
A3	Lesão Esquerda
A4d	Lesão Direita
A4e	Lesão Esquerda inicial

Legenda: A1 – amostra um; A2e – amostra dois (membro esquerdo); A3 – amostra três; A4d – amostra quatro (membro direito); A4e – amostra quatro (membro esquerdo). Fonte: Arquivo pessoal (2022).

Após o decorrer do intervalo de 15 dias, a 3^o coleta foi realizada. No entanto, as coletas foram realizadas em dois voluntários, pois o voluntário A3 teve seu tratamento transferido e o voluntário A1 não compareceu no horário estipulado para a coleta. De forma que, a análise ocorreu com as amostras obtidas dos pacientes A2 e A4, totalizando 4 amostras coletadas para análise microbiológica.

Tabela 3 - Amostras e áreas coletadas durante a 3^o coleta de material das feridas crônicas para análise microbiológica.

AMOSTRA	ÁREA(S)
A2d	Lesão Direita
A2e	Lesão Esquerda
A4d	Lesão Direita
A4e	Lesão Esquerda inicial

Legenda: A1 – amostra um; A2e – amostra dois (membro esquerdo); A3 – amostra três; A4d – amostra quatro (membro direito); A4e – amostra quatro (membro esquerdo). Fonte: Arquivo pessoal (2022).

O procedimento de coleta foi o mesmo para todos os dias de coleta no qual o swab foi mantido armazenado no tubo de ensaio com solução salina a 0,9% estéril, onde foi agitado vigorosamente por 1 minuto e realizada a inoculação primária utilizando a técnica de esgotamento de uma alíquota de 10ul em placa de Petri. As amostras foram inoculadas em Ágar nutriente. Em seguida, as placas foram incubadas em estufas aerobiamente a 36°C, analisadas após o período de 24 e 48 horas.

Com o crescimento positivo, as colônias foram submetidas a coloração de Gram. Logo após, foi realizada a inoculação das cepas bacterianas em Ágar MacConkey e Ágar Baird Parker, as placas foram incubadas em estufa a 36°C, analisadas após o período de 24 horas.

Com o crescimento diferencial em Ágar Baird Parker as colônias foram submetidas a prova da catalase, além de serem repicadas para crescimento no meio citrato e Ureia, os tubos foram incubados em estufa a 37°C. As amostras isoladas também foram submetidas ao ajuste de concentração em 0,5 de turbidez da escala MacFarland. Foi utilizado para turvamento do inóculo isolado e posterior isolamento em Ágar Mueller-Hinton para o antibiograma. Sendo analisados os seguintes antimicrobianos descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Antibióticos utilizados no teste de suscetibilidade antimicrobiana em amostras coletadas em feridas crônicas.

ANTIBIÓTICO	CONCENTRAÇÃO
Penicilina	10µg
Eritromicina	15µg
Tetraciclina	30µg
Cefoxitina	30µg
Bacitracina	30µg
Ceftazidima	30µg
Novobiocina	30µg
Meropenem	10µg

Fonte: Arquivo pessoal (2022).

A disco difusão foi aplicado em placas de Petri de maior volume, utilizando uma pinça estéril para evitar contaminação, mantendo a distância de 30mm entre os discos e de 15mm da margem da placa. Todos os discos foram levemente pressionados sob o Ágar. Os resultados do antibiograma foram interpretados após 24 horas. A leitura foi realizada com auxílio de paquímetro para medição do perímetro do halo. O perfil de resistência bacteriana foi analisado no decorrer de intervalos periódico entre as coletas. Após incubação em estufa a 36°C por 24hs, os resultados foram analisados seguindo os padrões da BrCast (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, versão 12.0, 2022), para leitura e interpretação dos halos presentes no antibiograma.

3. Resultados e Discussão

3.1 Caracterização da lesão dos voluntários

Após assinatura do TCLE e adesão ao estudo, os voluntários foram submetidos a coleta do material biológico, os voluntários apresentavam lesões provenientes de úlceras venosas e de foco infeccioso, conforme os dados do Quadro 1.

Quadro 1 - Caracterização da lesão dos voluntários atendidos no centro clínico.

Paciente	Idade	Sexo	Lesão
A1	61	F	Úlcera venosa
A2	62	F	Úlcera venosa
A3	57	M	Infecciosa
A4	45	M	Infecciosa

Fonte: Arquivo pessoal (2022).

3.2 Análise microbiológica

As amostras foram inoculadas no Ágar nutriente através da técnica de esgotamento, essa etapa foi essencial para o crescimento inicial dos microrganismos presentes na lesão, visto que o meio favorece a nutrição e o crescimento de diversos microrganismos patogênicos. Após a incubação, foi observado o crescimento de colônias brancas opacas (CBO), com bordas regulares, convexas e morfologia macroscópica semelhante nas amostras A1, A2, A3 e A4, conforme expresso na Tabela 5.

Tabela 5 - Crescimento microbiano nas amostras inoculadas em ágar nutriente durante as três coletas realizadas nos meses de agosto, setembro e outubro.

AMOSTRAS	Coleta 01	Coleta 02	Coleta 03
A1	CBO	CBO	X
A2d	X	CBO	CBO
A2e	CBO	X	CBO
A3	CBO	CBO	X
A4d	CBO	CBO	CBG
A4e	CBO	CBO	CBG

Legenda: CBO para A1, A2 e A3. CBG para A4 na terceira coleta, outubro de 2022. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

O padrão de crescimento morfológico em ágar nutriente se manteve durante a 2^o análise. Todavia, durante a 3^o análise as amostras A4e e A4d apresentou colônias com morfologias diferenciadas, sendo observado colônias grandes planas, com coloração branca opaca (CBG), aspecto mucoide e bordas de difusão.

A população polimicrobiana é um fator amplamente visualizado em feridas crônicas. A disbiose na microbiota e estabelecimento de espécies bacterianas diversificadas elevam o risco de multirresistência, assim como a constante agressão tecidual através da liberação de toxinas bacterianas prejudicam o processo de cicatrização (Wilkinson & Hardman, 2020).

Dessa forma, após a leitura das placas de Ágar Nutriente, as colônias foram submetidas a coloração de Gram para definição morfológica, o resultado obtido nas coletas foi expresso na Tabela 6.

Tabela 6 - Caracterização microbiana e coloração de Gram dos isolados de feridas crônicas.

AMOSTRAS	Coleta 01	Coleta 02	Coleta 03
A1	<i>Cocos em cachos (+)</i>	<i>Cocos em cachos (+)</i>	X
A2d	X	<i>Cocos em cachos (+)</i>	<i>Cocos em cachos (+)</i>
A2e	<i>Cocos em cachos (+)</i>	X	<i>Cocos em cachos (+)</i>
A3	<i>Cocos em cachos (+)</i>	<i>Cocos em cachos (+)</i>	X
A4d	<i>Cocos em cachos (+)</i>	<i>Cocos em cachos (+)</i>	<i>Cocos em cachos (+) e Bacilos (-)</i>
A4e	<i>Cocos em cachos (+)</i>	<i>Cocos em cachos (+)</i>	<i>Bacilos (-)</i>

Legenda: O "X" simboliza que não houve coleta de amostra. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

A coloração de Gram realizada na 3^a coleta, nas amostras A4d e A4e expôs a presença de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de divergentes morfologias, sendo essas bactérias selecionadas e isoladas, através de meios de cultivos diferenciais e seletivos. No Ágar MacConkey observou-se os resultados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados observados a partir da inoculação em ágar MacConkey de material coletado em feridas crônicas.

AMOSTRAS	Coleta 01	Coleta 02	Coleta 03
A1	Inibição parcial	Inibição total	X
A2d	X	Inibição total	Inibição total
A2e	Inibição parcial	X	Inibição total
A3	Inibição total	Inibição total	X
A4d	Inibição parcial	Inibição total	Lactose-negativa
A4e	Inibição parcial	Inibição total	Lactose-negativa

Legenda: Os espaços apresentando um “X” é a ausência de coleta. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

Onde o meio de cultura inibe de forma total ou parcial o crescimento de bactérias Gram-Positivas (Lactose-negativa), que com o crescimento parcial apresenta colônias incolores e favorece o crescimento de patógenos gram-negativos (Lactose-positiva) que apresentam colônias róseas. Assim como permite o crescimento e diferenciação de bactérias não fermentadoras da lactose como *Pseudomonas spp*, através do crescimento de colônias grandes mucoides ou não mucoides com coloração roseada, podendo ou não conter precipitação por Píocianina. Os resultados obtidos através desse meio foram representados na Tabela 7.

Os resultados obtidos na 3ª coleta com a inoculação das cepas no ágar MacConkey, apresentou um crescimento notável com alterações morfológicas nas amostras A4d e A4e. A amostra A4d apresentou colônias grandes roseadas com aspecto mucoide, o meio teve sua cor original modificada para um tom alaranjado. Enquanto, a amostra A4e verificou-se o crescimento de colônias grandes com precipitado azulado-esverdeado no meio de cultura, alertando para o indicativo da presença de *Pseudomonas spp*.

No voluntário A4, durante a realização da 3ª coleta, não havia curativo na lesão esquerda e grande presença de exsudato na lesão direita. O paciente relatou que a única mudança de rotina foi sua internação hospitalar, em virtude de acidente automobilístico.

Segundo Mody e colaboradores (2019) em estudo de corte longitudinal, com 651 pacientes admitidos na enfermagem hospitalar para internação, cerca de 56,8% apresentavam algum tipo de cepa bacteriana multirresistente. A triagem do estudo demonstrou que dos 558 pacientes que receberam alta hospitalar, aproximadamente 22,4% dos testados era hospedeiro para pelo menos uma espécie bacteriana multirresistente. Em comparação com outros estudos, foi observado que a colonização bacteriana multirresistente é proporcional ao tempo de internação de cada paciente. Esses dados alertam sobre a importância da biossegurança e da aplicação das medidas e precauções de contato.

Para identificação e isolamento das cepas bacterianas identificadas nas lesões como Gram-positivas, com morfologia de agrupamento em cachos ou duplas, foi utilizado um segundo meio de cultura para diferenciação bacteriana, o meio Baird Parker (BP), que é um meio seletivo e diferencial para *Staphylococcus aureus*. As colônias observadas nas três coletas e suas características foram descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Resultados observados a partir da inoculação em Ágar Baird Parker de material coletado em feridas crônicas.

AMOSTRAS	Coleta 01	Coleta 02	Coleta 03
A1	C.B. O	C.N +	X
A2d	X	C.N +	C.N +
A2e	C.B. O	X	C.N +
A3	C.B. O	C.N +	X
A4d	C.B. O	C.N +	C.N +
A4e	C.B. O	C.N +	C.N +

Legenda: O símbolo X significa ausência de coleta. C.B.O colônias brancas opalescentes; C.N+ colônias negras com a presença do halo de lecitinase. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

A triagem dos resultados prosseguiu com a realização de provas bioquímicas para identificação e confirmação bacteriana, com o intuito de avaliação do metabolismo bacteriano. A prova realizada na 1^a, 2^a e 3^a coleta consistiu na catalase, permitindo a diferenciação de cocos Gram-Positivo, como *Staphylococcus spp* (catalase-positiva), dos *Streptococcus spp* (catalase-negativa) através da conversão do peróxido de hidrogênio em oxigênio e água, os resultados foram descritos na Tabela 9. Com a presença de Bacilos Gram-negativos e os resultados obtidos a partir da inoculação no meio MacConkey, a amostra A4e e A4d foram submetidas ao teste da catalase que resultou na positividade da amostra, teste do citrato que demonstrou resultado positivo e Urease que apresentou negatividade. A análise qualitativa dos testes e resultados indicaram a presença de *Pseudomonas spp* e *Staphylococcus aureus*.

O estudo confirmou a presença de *Staphylococcus aureus* nas amostras A1, A2 e A3 durante todas as análises microbiológicas, enquanto na amostra A4 observou-se a presença de *Staphylococcus aureus* durante a 1^a e 2^a, na 3^a ocorreu a confirmação da presença mútua de *Staphylococcus aureus* no membro direito e de *Pseudomonas spp* no membro esquerdo.

Tabela 9 - Caracterização bioquímica dos isolados bacterianos das feridas crônicas dos voluntários atendidos no centro clínico.

CEPAS	Coleta 01	Coleta 02	Coleta 03
A1	Catalase +	Catalase +	X
A2d	X	Catalase +	Catalase +
A2e	Catalase +	X	Catalase +
A3	Catalase +	Catalase +	X
A4d	Catalase +	Catalase +	Catalase +
A4e	Catalase +	Catalase +	Catalase +

Legenda: símbolo "X" é a ausência de voluntário. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

A *Staphylococcus aureus* é abundantemente encontrada na pele humana, sendo capaz de provocar infecções simples até infecções graves, contudo, as infecções agudas podem dispersar-se para diferentes tecidos e resultar em focos metastáticos. O *S. aureus* não provoca infecções em pele saudável, mas quando a pele ou mucosa são lesionadas abre-se uma porta de entrada para a bactéria ter acesso a outros tecidos e corrente sanguínea, originando uma infecção grave (Cheung *et al.*, 2021).

Em um estudo com feridas crônicas, em 14% se obteve a presença de *Staphylococcus aureus*. Durante o mesmo estudo foi detectado um alto índice de resistência das cepas obtidas de lesões crônicas, e na maioria dos isolados a Leucocidina Pantone-Valentine (PVL) foi altamente difundido como característica genotípica para infecções cutâneas graves. A infecção por *Staphylococcus aureus* ocorre principalmente pela colonização epitelial normal da microbiota, visto que o patógeno é capaz de colonizar narinas, pele e órgãos (Cheung *et al.*, 2021).

Contudo, para que ocorra a infecção epitelial ou sistêmica por *Staphylococcus aureus* é necessário a penetração microbiana através da epiderme. Pequenos arranhões, orifícios lesados ou feridas representam uma porta de entrada invasiva. Na ausência da porta de entrada, a *S. aureus* é capaz de estimular a lesão epitelial através da a-toxina, que atua danificando o citoesqueleto de actina celular (Cheung *et al.*, 2021).

Quando a bactéria entra na pele, neutrófilos e macrófagos migram até o local da infecção para combater ao patógeno, porém, o *S. aureus* foge da resposta de diversas maneiras. A mesma possui vários fatores de virulência, através da presença de enzimas e proteínas, tais como a leucocidina Panton-Valentine, alfa-hemolisina (toxina alfa), modulinas solúveis em fenol (PSMS) e outras (Alvarez *et al.*, 2019).

A ação de proteínas relacionadas a virulência do microrganismo auxilia sua persistência e sobrevivência, assim como o mecanismo de virulência representa um pior quadro clínico para o paciente (Pietrocola *et al.*, 2017).

Com a ruptura na epiderme, a ação do *Staphylococcus aureus* delimita-se a evasão do sistema de defesa do hospedeiro. Essa etapa é superada com a migração do patógeno para órgãos e tecidos, dando início a construção de abscessos encapsulados. A fuga do sistema imune permanece com a atribuição de mecanismos de escape contra a ação de células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos. Com esse intuito *S. aureus* inibe a liberação de neutrófilos na corrente sanguínea do hospedeiro, assim como sua ativação e quimiotaxia. Além de, formar agregados e biofilme que impede a ação fagocítica das células. Outra ação de sobrevivência do patógeno é o controle de morte dos neutrófilos e eliminação de toxinas que estimulam a apoptose e morte celular (Cheung *et al.*, 2021).

No decorrer do ciclo infeccioso *Staphylococcus aureus* torna neutrófilos, macrófagos, células epiteliais, endoteliais, queratinócitos e osteoblastos uma ferramenta de escape do sistema imunológico do hospedeiro, se internalizando dentro dessas células. A persistência da bactéria contribui para disseminação e colonização da cepa, agravando os quadros de lesões crônicas (Cheung *et al.*, 2021).

Outro patógeno amplamente discutido sobre sua relação com lesões crônicas é a *Pseudomonas spp.* A bactéria *Pseudomonas spp* é um patógeno oportunista. Ela vive como um organismo comensal e ambiental, mas pode ocasionalmente mudar para um estado patogênico, causando infecções difíceis de tratar. Inclusive é a principal causa de infecções crônicas, especialmente a espécie *Pseudomonas aeruginosa*, uma vez que representa um importante patógeno humano. Atualmente, a *Pseudomonas spp* é uma das espécies bacterianas que desenvolveram um número alarmante de cepas multirresistentes. Essas cepas estão associadas a morbidade e mortalidade significativas e são responsáveis por 10% das infecções nosocomiais (Sousa *et al.*, 2021).

Entretanto, existem algumas evidências de que, além do dano epitelial, exoprodutos secretados por cepas de *Pseudomonas spp* podem prejudicar o reparo epitelial. O comprometimento da cicatrização de feridas cutâneas no modelo infectado pela cepa de *P. aeruginosa* que codifica T3SS funcional em comparação com feridas infectadas com mutante defeituoso para T3SS ou feridas não infectadas. A lesão térmica prejudica a função de barreira normal da pele (Qin *et al.*, 2022).

A *Pseudomonas spp* representa um dos patógenos nosocomiais mais difundidos entre as populações. Além de apresentar mecanismos de virulência e resistência aos antibióticos, a mesma é capaz de adquirir genes disponíveis em outras espécies ou ambiente, originando cepas multirresistentes. A cepa de *Pseudomonas aeruginosa* antes restrita ao ambiente hospitalar é comumente encontrada na microbiota epitelial de seres humanos, sua presença na comunidade favorece sua disseminação entre hospedeiros e ambientes, contudo o maior contato com o patógeno ainda é mais observado no ambiente hospitalar. A alta capacidade de colonização da *Pseudomonas spp*, favorece a formação de biofilmes em superfícies, feridas, tecidos e órgãos. Segundo o estudo, cerca de 60% a 80% das bactérias isoladas de feridas crônicas, encontram-se em biofilme (Qin *et al.*, 2022).

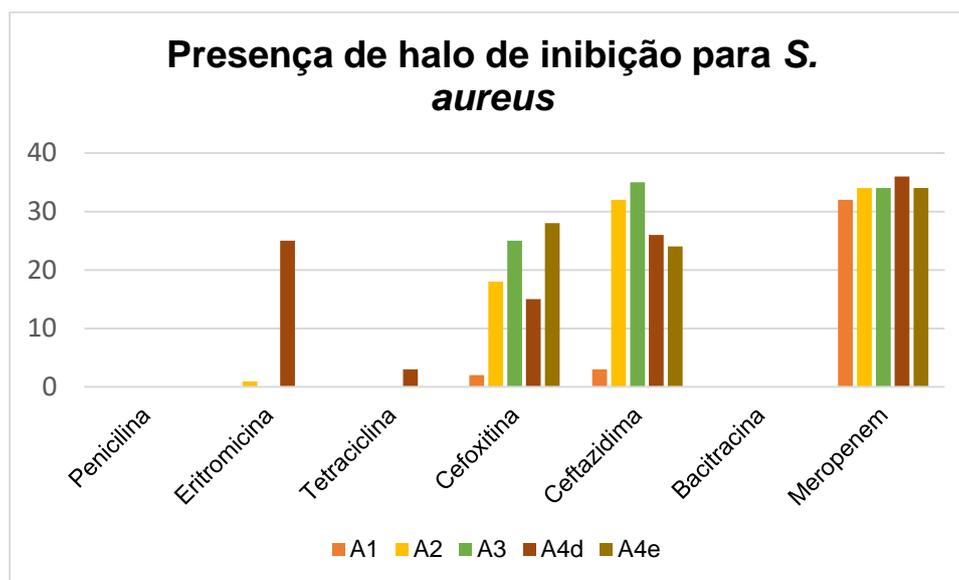
As *Pseudomonas spp* são altamente temidas em quadros de infecções por sua alta virulência, especialmente a *Pseudomonas aeruginosa*. Alguns mecanismos de virulência deste patógeno favorece a sua sobrevivência em lesões crônicas (Martín *et al.*, 2021).

3.3 Resistência Bacteriana em Lesões Crônicas

Originalmente os antibióticos têm como objetivo central a estrutura proteica da bactéria. O DNA bacteriano descodifica milhares de genes que apresentam mecanismos de sobrevivência. O envelope celular das bactérias Gram-positivas resume-se a uma bicamada lipídica que circula o citoplasma e a parede celular construída por polímeros de peptidoglicano. As bactérias Gram-negativas apresentam morfologia mais complexa, duas membranas lipídicas envolvem o periplasma rico em proteínas, onde apresentam-se os peptidoglicanos que é mais fino do que em Gram-positivas. O envelope externo bacteriano Gram-negativo é rico em lipolissacarídeo. O mecanismo de resistência é associado a presença de enzimas, proteínas, plasmídeos, bombas de efluxo e outros mecanismos que garantem a sobrevivência bacteriana (Fisher & Mbashery, 2019).

Os resultados obtidos do teste de susceptibilidade microbiana demonstraram alto índice de resistência aos antimicrobianos testados. Na 1ª coleta, conforme Gráfico 1, o meropenem apresentou efeito sobre todos os isolados.

Gráfico 1 - Análise de comportamento das cepas isoladas na coleta 1, de material biológico proveniente de feridas crônicas.



Legenda: A ausência do cumprimento do halo indica resistência ao antimicrobiano testado. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

Uma das características marcantes do biofilme é a capacidade das bactérias presentes sobreviverem a tratamentos antimicrobianos em elevadas doses. Em casos da dispersão do biofilme, as bactérias demonstram baixos valores de concentração inibitória mínima (Ciofu & Nielsen, 2019).

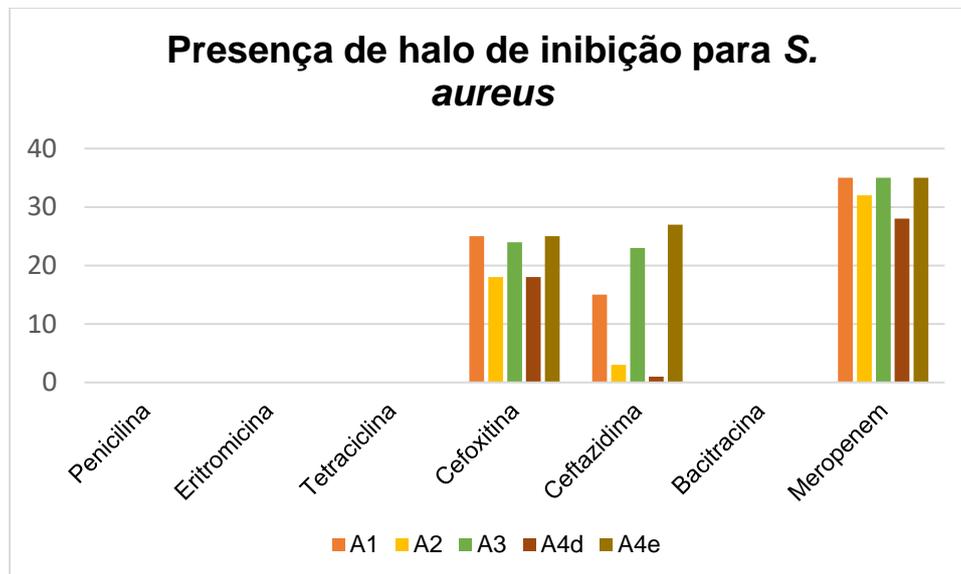
Um estudo realizado em 2020, denotou que a bactéria *Staphylococcus aureus* é um grande exemplo de resistência a diversos antibióticos como meticilina, vancomina, penicilina e grupo geral dos B-lactâmicos. Recentemente, foi descoberto a ação de uma nova enzima como mecanismo de resistência desse patógeno, denominada de proteínas ligadoras de penicilina tipo 2 (PBP2). A PBP2 desempenha um papel monofuncional, diferentemente da PBP1 que é bifuncional, a PBP2 atua contra a classe antibiótica dos B-lactâmicos inibindo a distinção das hastes de receptores do antimicrobiano. A acilação irreversível também funciona como alerta para a presença do antibiótico. Resumidamente, as bactérias utilizam sua segunda membrana como escudo

a permeabilidade dos antibióticos assim como, constroem sua membrana periplasmática com base em enzimas com característica resistente codificadas por plasmídeos, além de utilizarem a motilidade e multiproteínas inibitórias. E a, produção de penicilinase que realiza a hidrólise do anel B-lactâmico da penicilina (Fisher & Mobashery, 2019).

Essas bactérias são difíceis de tratar, fazendo necessário o uso de antibioticoterapia, em doses mais elevadas ou usar medicamentos alternativos. A *S. aureus* é um exemplo de bactéria multirresistente estando associada a comunidade e associada ao hospital. As cepas são diversas, podendo ser epidêmicas. Os seres humanos podem contrair a *S. aureus* no em contatos da vida cotidiana, uma vez que esse microrganismo pode tráfegar de pele em pele e entrar no corpo de uma pessoa através de um corte ou ferida, de forma que a infecção se torna grave quando atinge e infectar ossos, sangue, articulações, coração e pulmão, podendo se tornar fatal. A prevenção de infecções epiteliais crônicas é importante uma vez que a *S. aureus* é resistente a muitos antibióticos, tornando a cicatrização e tratamento mais difícil (Hughes *et al.*, 2017).

Na coleta 02, foi observado um aumento na taxa de resistência, conforme Gráfico 2, onde houve resistência a penicilina, eritromicina, tetraciclina e bacitracina.

Gráfico 2 - Análise de comportamento das cepas isoladas na coleta 2, de material biológico proveniente de feridas crônicas.



Legenda: A ausência do cumprimento do halo indica resistência ao antimicrobiano testado. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

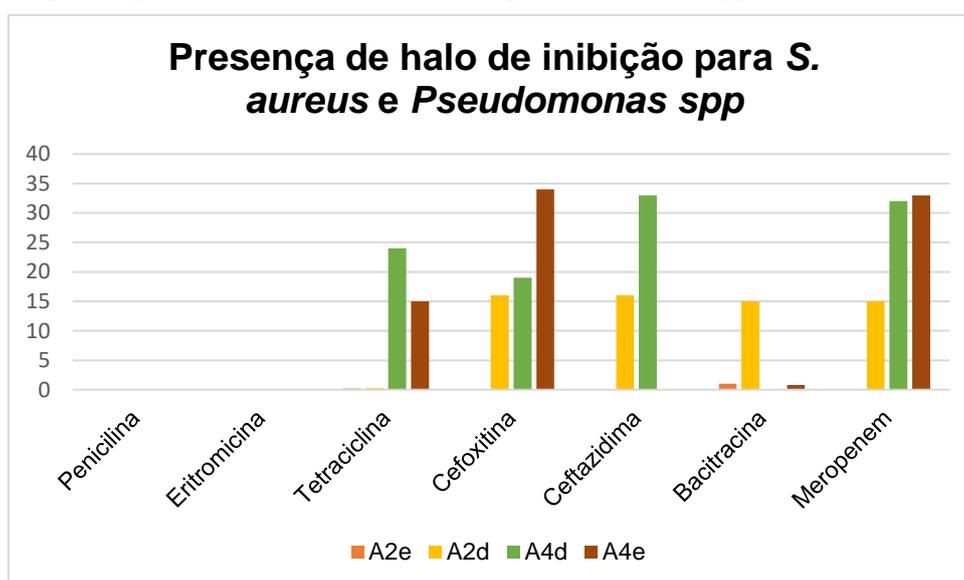
A bactéria *Staphylococcus aureus* representa o grupo de cepas que possuem o cassete genético SSC mec, que contém diversos genes associados a resistência. Com a seleção natural e evolução desses patógenos, o cassete SSC mec construiu vários subtipos adicionando e excluindo genes de resistência. Um fator essencial para elaboração do mecanismo de resistência de *S. aureus* as múltiplas drogas é a presença de proteínas que atuam no bombeamento dos antibióticos para fora do meio intracelular, atualmente as principais são QacA, NorA e Smr (Guo *et al.*, 2020).

As proteínas atuantes como bomba de efluxo não dependem da quebra de ATP para obtenção de energia, ao invés disso utilizam um gradiente eletroquímico apresentando H⁺ em ambas as extremidades da membrana. Comumente, a atuação da molécula de H⁺ é reversível, onde a molécula se desloca do meio extracelular para o intracelular, enquanto as substâncias danosas presentes no meio intracelular da célula bacteriana, como as moléculas do antibiótico, são expelidas para fora da bactéria. Esse fenômeno permite a resistência a antibióticos antes utilizados na antibioticoterapia (Guo *et al.*, 2020).

Na 3ª coleta algumas evoluções foram observadas no antibiograma conforme Gráfico 3, de forma que as cepas analisadas demonstraram uma resistência aumentada a antibióticos antes sensíveis. As placas contendo *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp*, provenientes da amostra A4 foram submetidas ao antibiograma. Assim como, as amostras A2.

A interação bacteriana dentro do biofilme favorece o aumento da patogenicidade das cepas presentes. As cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* são as mais identificadas em lesões crônicas. Comumente, a *P. aeruginosa* é encontrada em regiões mais profundas da lesão, enquanto *S. aureus* encontra-se mais superficialmente, no entanto esse equilíbrio pode ser alterado devido fatores intrínsecos e extrínsecos. A presença desses microrganismos aumenta a resposta inflamatória, a tolerância antimicrobiana é diminuída e consequentemente ocorre a cronificação da ferida (Pouget *et al.*, 2022).

Gráfico 3 - Análise de comportamento das cepas isoladas na coleta 3, de material biológico proveniente de feridas crônicas. A2d, A2e e Ad testado para *Staphylococcus aureus* e A4e testado para *Pseudomonas spp*.



Legenda: A ausência do cumprimento do halo indica resistência ao antimicrobiano testado. Fonte: Arquivo pessoal (2022).

A expressão da enzima B-lactamase em conjunto com a expressão do gene AmpC, acompanhada de uma alta presença de bombas de efluxo e aumento na impermeabilidade da membrana, constrói uma resistência adicional aos carbapenêmicos. Dessa forma, a membrana celular bacteriana da *P. aeruginosa* torna-se uma grande muralha que dificulta a entrada dos antibióticos. As porinas são altamente difundidas nesse patógeno, especialmente a OprD e OprF (Mahmood & Hussein, 2022).

A proteína OprF é capaz de manter seu confômero fechado, gerando uma baixa eficácia de permeabilização por parte dos antibióticos. Outra porina específica, a OprD encontra-se envolvida no processo de absorção de antibióticos. Essa porina contém sítios de ligação para a classe dos carbapenêmicos, entretanto a *Pseudomonas spp* é capaz de controlar a sua expressão na membrana celular (Pang *et al.*, 2019).

Outro fator de resistência observado na *P. aeruginosa*, é a presença de bombas de efluxo. A família mais comumente encontrada na cepa é a de resistência-nodulação-divisão ou RND, essa família de bombas de efluxo desempenham um papel essencial na resistência antibióticos. Esse complexo é classificado como um efluxo multidrogas, sendo constituído por quatro principais: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY- OprM. De forma que a MexAB-OprM atua especialmente na expulsão de B-lactâmicos e quinolonas, a MexCD-OprJ atua contra os B-lactâmicos, enquanto MexEF-OprN e MexXY- OprM desempenham ação contra quilonas e aminoglicosídeos. A alta expressão de bombas de efluxo constitui um dos fatores que contribuem para a multirresistência de *Pseudomonas spp* (Pang *et al.*, 2019).

A resistência multidrogas presente em *Pseudomonas spp*, é resultado de um conjunto de fenômenos, incluindo a aquisição de novas características genotípicas por mutações, aquisição de genes ou transferência horizontal. As mutações genéticas da célula bacteriana são capazes de moldar a resistência da bactéria, seja modificando o alvo do antibiótico; gerando bombas de efluxo ou produzindo enzimas inativadoras. Segundo pesquisas, foi observado a capacidade da *P. aeruginosa* de reduzir a presença de OprD, elevando a resistência aos carbapenêmicos (Pang *et al.*, 2019).

Os genes de resistência podem ser repassados por cepas da mesma espécie ou espécies distintas, o transporte desses genes pode ocorrer através de plasmídeos, transposon, integrons e profagos. A troca dessas informações torna-se mais intensa na presença de uma população polimicrobiana ou no interior do Biofilme (Pang *et al.*, 2019).

Foi possível observar que o isolado A2 foi o que apresentou maior nível de resistência durante as coletas, conforme Gráfico 4. Esse resultado pode estar vinculado a presença de biofilme nas lesões.

O biofilme representa um conjunto de microrganismos que se fixam uns aos outros em uma superfície viva ou inanimada, essa comunidade bacteriana é envolta por uma matriz autoproduzida de produtos poliméricos extracelulares (exopolissacarídeos, proteínas, metabólitos e DNA). A parceria dos microrganismos presentes no biofilme, os tornam menos sensíveis a ação de antimicrobianos e a ação imunológica do hospedeiro. Segundo pesquisas, mesmo bactérias com sensibilidade a um determinado antibiótico pode tornar-se resistente quando incorporada a um biofilme, ou seja, a resistência mediante o biofilme é independente de alterações genéticas, caracterizando um mecanismo adaptativo. O biofilme atua impedindo a penetração de antibióticos no microambiente, além de gerar respostas de estresse adaptativo e diferenciação celular persistente (Pang *et al.*, 2019).

A presença de células persistentes de *Pseudomonas spp* favorece a formação de biofilmes. As células bacterianas persistentes representam um conjunto de células que são geneticamente semelhantes, mas fenotipicamente distintas. Esse grupo cresce lentamente ou permanece dormentes, favorecendo sua sobrevivência a altas concentrações de antibióticos. Esse fenômeno caracteriza um estado fisiológico da bactéria que resiste momentaneamente ao estresse da antibioticoterapia e garantem sua sobrevivência. No ambiente sob estresse a maioria das cepas é morta imediatamente, entretanto, uma pequena parcela resiste a essa pressão cessando seu crescimento e permanecendo inativa (Pang *et al.*, 2019).

O crescimento bacteriano em feridas crônicas representa um alto risco ao ciclo de cicatrização. A comunidade bacteriana é capaz de provocar graves infecções cutâneas e sistêmicas, incluindo bacteremia. Embora a taxa de mortalidade por lesões crônicas tenha diminuído em alguns países, a colonização bacteriana dessas feridas é um desafio a saúde pública. A multirresistência associada a essa população bacteriana presente em lesões, atribui novos riscos ao tratamento dos hospedeiros (John, 2020).

Os isolados de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp* são delimitados como patógenos oportunistas. Em pacientes com a barreira epitelial íntegra as chances de contaminação são mínimas, contudo, esse cenário é alterado quando ocorre uma lesão epitelial mecânica ou estimulada pela ação de virulência desses patógenos. A presença de mecanismos de resistência multidrogas em ambos os patógenos são preocupantes, visto que favorece a sobrevivência do patógeno na lesão. Consequentemente a probabilidade de formação de biofilme, troca de genes relacionados a resistência e formação de uma população polimicrobiana é elevada (John, 2020).

4. Conclusão

A persistência da lesão e colonização bacteriana torna-se preocupante pelo aumento do tempo de tratamento e alta susceptibilidade, além do agravamento do quadro clínico e infeccioso do paciente. A presença de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas spp* nas amostras analisadas retratam a ação infecciosa desses patógenos em lesões crônicas. Durante as três coletas as amostras microbiológicas resultaram em dados qualitativos distintos, apontando para o avanço da multiplicação bacteriana. O

tratamento antimicrobiano é fundamental para o auxílio e diminuição do estresse celular, favorecendo o processo de cicatrização e recuperação física do paciente.

Outro fator importante é a necessidade da biossegurança e aplicação das precauções durante a realização dos curativos, evitando a contaminação cruzada e o aumento da comunidade microbiana na lesão. A presença dessa comunidade polimicrobiana resulta em um mau prognóstico ao paciente, uma vez que aumenta as chances de formação de biofilme e favorece a troca de genes relacionados a resistência. Contudo, os presentes resultados demonstram a necessidade de aprofundar os estudos sobre a interação da comunidade bacteriana e o processo de cicatrização em feridas crônicas, observando a nível celular os danos provocados pela colonização resistente de cepas.

Referências

- Atkin, L. (2019). Chronic Wounds: the challenges of appropriate management. *British Journal of Community Nursing*, 1, 26-32.
- Bowers, S., & Franco, E. Chronic Wounds: Evaluation and Management. *American family Physician*, 3 (101), 159-166.
- Bibalan, M. H., *et al* (2021). Pseudomonas aeruginosa wound infection: A systematic review and meta-analysis. *Burns*, 47, 538-544.
- Buch, P. J., *et al* (2021). Bacterial chatter in chronic wound infections. *Wound Healing Society the European Tissue Repair Society*, 1, 106-116.
- Ciofu, O., & Nielsen, T. T. (2019). Tolerance and Resistance of Pseudomonas aeruginosa Biofilms to Antimicrobial Agents – How P. aeruginosa can Escape Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 3, 9-13.
- Cristancho, S. M., *et al* (2018). Qualitative research essentials for medical education. *Singapore medicinal journal*, 59(12), 622-627.
- Cheung, G. Y. C., *et al* (2021). Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence*, 1, 547-569.
- Eichenberger, E. M., & Thaden, J. T. (2019). Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 2(8), 37.
- Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2019). Constructing and deconstructing the bacterial cell wall. *Protein science*. 3(29), 629-646.
- Goldberg, S., & Diegelmann, R. (2020). What makes wounds chronic. *The surgical of north america*, 4, 681-693.
- John, J., *et al* (2022). The treatment of resistant staphylococcal infections. *F1000 research*, 1, 9 -15.
- Hughes, D., & Diarmaid, A. (2017). Evolutionary trajectories to antibiotic resistance. *Annual review of microbiology*, 8(71), 579-596.
- Huitema, L., *et al* (2021). Intracellular escape strategies of staphylococcus aureus in persistent cutaneous infections. *Exp dermatology*, 10, 1428-1439.
- Regli, A. D., & Jean-marie, A. (2021). Clinical status of efflux resistance mechanisms in gram-negative bacteria. *Antibiotics*, 9(10), 11-17.
- Ruiz, M., *et al* (2018). Assesment of chronic wounds in adults: na integrative review. *Revista da escola de enfermagem da USP*, 1(1), 1-10.
- Sousa, T., *et al* (2021). Genomic and metabolic characteristics of the pathogenicity in pseudomonas aeruginosa. *MDPI open access journal*, 22, 1-13.
- Mody, L., *et al* (2019). Multidrug-resistant organisms in hospirals: what is on patient hands and in their rooms? *Clicical infectious disease: an official publication of the infectious diseases society of america*, 11(69), 1837-1844.
- Mahmood, R., & Hussein, M. N. (2022). Study of antibiotic resistant genes in pseudomonas aeruginosa isolated from burns and wounds. *Archives of razi institute*, 1, 403-411.
- Martín, I. J., *et al* (2021). Pseudomonas aeruginosa: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. *International journal of molecular sciences*, 6, 22-31.
- Pouget, C., *et al* (2022). Polymicrobial biofilm organization of staphylococcus aureus and pseudomonas aeruginosa in a chronic wound environment. *International journal of molecular sciences*, 18, 15-23.
- Pang, Z., *et al* (2019). Antibiotic resistance in pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology advances*, 3, 1771-192.
- Qin, Y., *et al* (2020). Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in staphylococcus aureus. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 10-18.
- Qin, S., *et al* (2022). Pseudomonas aeruginosa: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal transduction and target therapy*, 7, 1-19.
- Silva, V., *et al* (2018). Prevalence and susceptibility pattern of bacteria isolated from infected chronic wounds in adult patients. *Organo oficial de la sociedade chilena de infectologia*, 2, 155-162.

- Tomic-canic, M., *et al* (2020). Skin microbiota and its interplay with wound healing. *American journal of clinical dermatology*, 1(21), 36-43.
- Vanderwoude, J., *et al* (2022). The evolution of virulence in *pseudomonas aeruginosa* during chronic wound infection. *Proceedings biology science*, 18, 19-37.
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J (2020). Wound healing cellular mechanisms and pathological outcomes. *The royal society publishing*, 9(10), 200-223.
- Wong, S. Y., *et al* (2015). Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria from acute and chronic wounds in Malaysian subjects. *The Journal of infection in developing countries*, 9(9), 36-44.
- Yu, J. A., & Gao, X, X (2019). Bacterial biofilm and chronic wounds infection. *Zhonghua shao shang za zhi: chinese journal of burns*, 12(35), 842-847.