



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Taís Lopes Saranholi

**HIDROFIBRA COM PRATA VERSUS COLAGENASE
PARA TRATAMENTO DA COLONIZAÇÃO CRÍTICA
EM ÚLCERAS VENOSAS: ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO**

Tese de doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina, Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Câmpus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutora em
Enfermagem.

Orientadora: Prof^ª Ass Luciana Patrícia Fernandes Abbade
Colaboradora: Prof^ª. Ass. Vera Lucia Mores Rall

Botucatu

2022

Taís Lopes Saranholi

HIDROFIBRA COM PRATA VERSUS COLAGENASE
PARA TRATAMENTO DA COLONIZAÇÃO CRÍTICA
EM ÚLCERAS VENOSAS: ENSAIO CLÍNICO
RANDOMIZADO

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de Doutora
em Enfermagem.

Estudante: Natalie Carlos Ferreira Mello Sampaio
Orientadora: Prof^a Ass Luciana Patrícia Fernandes Abbade
Colaboradora: Prof^a. Ass. Vera Lucia Mores Rall

Botucatu

2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Saranholi, Tais Lopes.

Hidrofibra com prata versus Colagenase para tratamento da colonização crítica em úlceras venosas : ensaio clínico randomizado / Tais Lopes Saranholi. - Botucatu, 2022

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Luciana Patrícia Fernandes Abbade

Coorientador: Vera Lucia Mores Rall

Capes: 40406008

1. Ensaio clínico. 2. Infecção dos ferimentos.
3. Pacientes ambulatoriais. 4. Úlcera varicosa.

Palavras-chave: Ensaio clínico; Infecção das feridas; Pacientes ambulatoriais; Úlcera venosa.

TAÍS LOPES SARANHOLI

**Hidrofibra com prata versus Colagenase para tratamento da colonização crítica em úlceras venosas:
ensaio clínico randomizado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Enfermagem.

Orientadora: Prof^a Ass Luciana Patrícia Fernandes Abbade

Comissão examinadora

Dra. Meire Cristina Novelli e Castro
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Dra. Raquel Colenci
Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP

Dra. Beatriz Guitton Renaud Baptista de Oliveira
Universidade Federal Fluminense

Dra. Ana Paula Favaro Trombone Garlet
Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO

Botucatu, 29 de agosto de 2022.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A minha família, aqueles que sempre me incentivaram e ajudaram para essa conquista. Muito obrigada. Em especial ao meu amado esposo, Diego Acosta Mosela, pela sua presença em minha vida, por sua confiança, dedicação e pela paciente espera nos momentos de ausência nessa trajetória.

A vocês minha eterna gratidão!

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por todas as graças recebidas, por me dar forças para superar as dificuldades, agradeço por mais essa etapa conquistada em minha vida. O meu mais profundo agradecimento à Professora Doutora Luciana Patrícia Fernandes Abbade, pela amizade, acolhida e orientação deste trabalho, por acreditar em mim e contribuir para sua realização, e todo seu carinho, minha mais profunda gratidão.

Agradeço a Natalie Carlos Ferreira Mello Sampaio por sua generosidade, contribuição e acolhimento.

À Professora Doutora Vera Lucia Mores Rall e Doutora Stéfani Thais Alves Dantas pelo seu acolhimento e contribuição nas análises deste trabalho, agradeço profundamente as contribuições e a presença nessa caminhada. A Rita de Cássia Altino e Márcia Aparecida Nuevo Gatti, por todos os conselhos, dificuldades compartilhadas, angústias e muitas alegrias. A vocês minha sincera e eterna amizade, muito obrigada por tudo.

Ao corpo docente do curso de Doutorado Acadêmico em Enfermagem – Programa de Pós-graduação em Enfermagem do Departamento de Enfermagem da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, agradeço imensamente a oportunidade e o privilégio de realizar esse curso, no qual contribui para minha formação profissional e pessoal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa e financiamento do projeto (processo nº: 2020/01768-3).

Enfim, a todos aqueles que de uma maneira ou outra, contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Saranholi, Taís Lopes. Hidrofibra com prata versus Colagenase para tratamento da colonização crítica em úlceras venosas: ensaio clínico randomizado. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. 2022.

Introdução: Úlceras venosas (UV) são colonizadas por diversas bactérias, sendo algumas com grande capacidade de produção de biofilme, colonização crítica (infecção superficial) que podem dificultar a cicatrização. **Objetivos:** Avaliar a ação do curativo hidrofibra com prata comparado ao curativo com colagenase, ambos após desbridamento cirúrgico superficial, no controle da colonização crítica, formação do biofilme por *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis* e clonalidade bacteriana entre o tempo inicial e final, em pacientes com UV que utilizaram estas intervenções por 30 dias. **Método:** Ensaio clínico randomizado, controlado com pacientes com UV com sinais clínicos de colonização crítica. Após desbridamento superficial, os participantes foram randomizados em dois grupos – intervenção foi Hidrofibra com prata (HAg) e o comparativo Colagenase (Col). Realizado pré-desbridamento, coleta com swab em área de 1cm² para identificação de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa* e cálculo do número de UFC/cm². Avaliada a capacidade de produção de biofilme em microplaca de poliestireno. Os desfechos foram avaliados após 30 dias: primários: taxa de úlceras sem sinais de colonização crítica; taxa de úlceras com diminuição da carga bacteriana; taxa de úlceras com bactérias produtoras de biofilme e clonalidade bacteriana. Os desfechos secundários foram: melhora clínica das UV pelo PUSH; diminuição da área ulcerada. A análise estatística foi por intenção de tratar e os dados foram analisados utilizando o software SPSS 22.0, considerado significativo $p < 0,05$. **Resultados:** Foram incluídos 34 pacientes, totalizando 56 UV. Dezoito participantes com 28 UV foram randomizados para o grupo HAg e 16 participantes com 28 UV para o grupo Col. Houve diminuição de úlceras com critérios de colonização crítica nos dois grupos ao longo do tempo, sem diferença estatisticamente significativa entre as duas intervenções, pois no T30 o risco relativo (RR) para não colonização crítica foi de 0,81 (IC95% 0,48 – 1,37; $p = 0,439$). Em relação a carga bacteriana, não houve diminuição da carga bacteriana total ao longo do tempo ($p = 0,054$) e nem entre os grupos ($p = 0,113$). Houve diminuição de úlceras com bactérias produtoras de biofilme em relação T0 ao T30 ($p = 0,047$), mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos no T30 com RR de 1,0 (IC95% 0,35 – 2,86; $p > 0,999$). A maioria das úlceras não tiveram mudança da identidade bacteriana entre T0 e 30, sem diferença entre os grupos. Houve melhora clínica das UV avaliadas pelo PUSH de acordo com o tempo para os dois grupos ($p = 0,001$), mas sem diferença com significância estatística entre os grupos ($p = 0,067$). Houve diminuição das áreas nos dois grupos em função do tempo ($p = 0,001$), mas sem diferença com significância estatística entre os grupos ($p = 0,786$). **Conclusão:** Ambas as intervenções, hidrofibra com prata e colagenase, melhoraram as características clínicas e microbiológicas ao longo do tempo, mas não houve diferença entre as duas intervenções após 30 dias de tratamento.

Palavras Chaves: Úlcera Venosa. Infecção das Feridas. Pacientes Ambulatoriais. Ensaio clínico.

ABSTRACT

Saranholi, Taís Lopes. Hydrofiber with silver versus Collagenase for treatment of critical colonization of venous ulcers: randomized clinical trial. Botucatu: Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP). 2022.

Background: Venous ulcers (VU) are colonized by several bacteria, some of which have a high capacity for biofilm production that can make healing difficult. **Objectives:** To evaluate the action of the hydrofiber dressing with silver compared to the dressing with collagenase, both after superficial surgical debridement, in control of critical colonization (superficial infection) by *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus epidermidis* and the biofilm formation by these bacteria in patients with VU who used these interventions for 30 days. **Method:** Randomized, control clinical trial with VU patients with clinical signs of critical colonization. After superficial debridement, participants were randomized into two groups - Hydrofiber with silver (HAg) and Collagenase (Col). Pre-debridement with a 1cm² swab to identify *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa* and calculate the number of CFU/cm². The projects were published after 30 days: primary - rate of consultations without signs of criticism; ulcer rate with bacterial load; rate of ulcers with biofilm producers. The secondary results were clinical improvement of VU by PUSH; enlargement of the ulcerated area. A statistical analysis was for intent-to-treat and data were analyzed using SPSS 22.0 software $P < 0.05$ was considered significant. **Results:** 34 patients were included, totaling 56 VU. Eighteen participants with 28 VU were randomized to the HAg group and 16 with 28 VU to the Col group. There was an increase in studies with critical colonization criteria in both groups over time, with no statistically significant difference between the two interventions ($p = 0.422$). Regarding bacterial load, there was no increase in total bacterial load over time ($p = 0.054$) or between groups ($p = 0.113$). There was an increase in consultations with biome producers in relation to T0 to T30 ($p = 0.047$), but with no difference with statistical significance between the groups at T30 ($p = 0.558$). There was clinical improvement in the VU groups evaluated by PUSH according to time for two groups ($p = 0.001$), but with no statistical difference between them ($p = 0.067$). There was an increase in areas in both groups as a function of time ($p = 0.001$), but with no difference with statistical significance between the groups ($p = 0.786$). **Conclusion:** Both interventions, hydrofiber with silver and collagenase, improved clinical and microbiological characteristics over time, but there was no difference between the two interventions after 30 days of treatment.

Key words: Varicose Ulcer. Wound Infection. Outpatients. Clinical trial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo do Biofilme.	18
Figura 2	Faixa elástica compressiva que foi utilizada no estudo	26
Figura 3	Mensuração da área da úlcera por meio do software <i>Image J 1.37v</i>	28
Figura 4	Coleta com swab na úlcera colonizada em uma área de 1 cm ²	30
Figura 5	Exemplo de semeador na superfície de uma placa de ágar sangue	31
Figura 6A	Exemplo de semeador na superfície de uma placa de ágar cetrímide	31
Figura 6B	Exemplo de semeador na superfície de uma placa de ágar manitol	31
Figura 7	Fluxograma da coleta de amostra e encaminhamento ao laboratório	35

LISTA DE TABELA

Quadro 1	Classificação das cepas em relação à produção de biofilme.	32
Tabela 1	Distribuição dos 34 participantes (56 úlceras) por grupo de estudo de acordo com dados demográficos e clínicos no tempo basal (T0).	54

TABELAS E FIGURAS SUPLEMENTARES

Figura 1	Número de úlceras do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase com sinais clínicos de colonização crítica segundo o NERDS no T0 e T30.	69
Figura 2	Log da carga bacteriana das espécies avaliadas totais das úlceras no tempo basal (T0) e após 30 dias (T30), nas úlceras do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase.	69
Figura 3	Carga bacteriana de <i>S. aureus</i> e <i>P. aeruginosa</i> das úlceras no tempo basal (T0) e após 30 dias (T30), do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase.	70
Figura 4	Carga bacteriana da família enterobacteriaceae e <i>S. epidermidis</i> das úlceras no tempo basal (T0) e após 30 dias (T30), do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase.	70
Figura 5	Carga bacteriana <i>S. coagulase</i> negativo e de bactérias não identificadas das úlceras no tempo basal (T0) e após 30 dias (T30), do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase.	70
Figura 6	Elektroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene <i>oprI</i> (249 pb). Poços 1: 100 pb DNA ladder; poço 2: controle negativo; poço 3: ATCC 9027; poços 4-26: amostras.	71
Figura 7	Elektroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene <i>nuc</i> (257pb). Poços 1: 100 pb DNA ladder; poço 2: controle negativo; poço 3: ATCC USA300; poços 4-26: amostras.	71
Tabela 1	Resultados do dendrograma de similaridade genética das úlceras com <i>S. aureus</i> .	72
Tabela 2	Resultados do dendrograma de similaridade genética das úlceras com <i>P. aeruginosa</i> .	74

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Col	Colagenase
HAg	Hidrofibra
IBB	Instituto de Biociências (Unesp – Botucatu)
ITB	Índice tornozelo-braquial
PFGE	<i>Pulsed Field Gel de Eletroforese</i>
PHMB	Polihexametileno de biguanida
PUSH	<i>Pressure Ulcer Scale for Healing</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TVP	Trombose Venosa Profunda
UV	Úlcera Venosa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Primário	23
2.2 Objetivos Secundários.....	23
3 MÉTODO.....	24
3.1 Tipo de Estudo.....	24
3.2 Local do Estudo,	24
3.3 População e critérios de elegibilidade.....	24
3.4 Delineamento do Estudo, plano de tratamento e desfechos	25
3.5 Procedimentos	27
3.5.1 Avaliação da área das úlceras	27
3.5.2 Avaliação das características dos leitos das UV	28
3.5.3 Avaliação clínica de infecção superficial das UV.....	28
3.5.4 Avaliação da melhora clínica das UV	28
3.6 Análises microbiológicas	29
3.6.1 Coleta das amostras	29
3.6.2 Identificação das espécies.....	30
3.6.2.1 Identificação de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>	30
3.6.2.2 Identificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	31
3.6.3 Produção de biofilme em microplaca de poliestireno	32
3.6.4 Eletroforese em gel de campo pulsado (<i>Pulsed Field Gel de Eletroforese</i> - PFGE)	32
3.6.4.1. Parâmetro do PFGE para <i>S. aureus</i>	33
3.6.4.2. Parâmetro do PFGE para <i>P. aeruginosa</i>	33
3.7 Variáveis	36
3.8 Análise dos Dados.....	36
3.8.1 Tamanho amostral	36
3.8.2 Critérios de randomização e de ocultação da alocação	36
3.8.3 Análise Estatística	37
3.9 Procedimentos éticos.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
4 MANUSCRITO.....	43
REFERÊNCIAS DO MANUSCRITO.....	65
5 CONSLUSÕES.....	68
6 TABELAS E FIGURAS SUPLEMENTARES	69
APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	755
APÊNDICE II – CARACTERIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS DOS MEMBROS INFERIORES	77
APÊNDICE III – ORIENTAÇÕES DE CURATIVO	86
APÊNDICE IV – TUTORIAL PARA MEDIDAS DA ÁREA DA ÚLCERA.....	88
APÊNDICE V – ESCALA DE <i>PRESSURE ULCER SCALE FOR HEALING</i> (PUSH)	95
5	
ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	96

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceito de úlcera e classificação

A úlcera cutânea se caracteriza por uma lesão com perda de tecido, envolvendo a epiderme, derme, podendo atingir tecido celular subcutâneo ou tecidos mais profundos. Quanto a sua origem, as úlceras podem ser: traumáticas, sendo provocadas acidentalmente por agentes mecânicos (corte, perfuração), agentes químicos e físicos (calor, frio, radiação); cirúrgicas (provocada intencionalmente por instrumento cirúrgico cortante) ou serem causadas por doenças de base, como por exemplo as de causa venosa, arterial, neuropática¹.

As úlceras podem ser classificadas em agudas e crônicas. Quando agudas, as fases do processo de cicatrização não apresentam complicações e ocorrem naturalmente. Nas crônicas, o processo de cicatrização não ocorre no tempo e na sequência fisiológica das fases inflamatórias, proliferativas e de maturação. Caracterizam-se como feridas crônicas as que não cicatrizam em 4 a 6 semanas².

Diferentes doenças podem retardar o processo de cicatrização, assim como fatores externos podem interferir nesse processo. Como exemplos podem ser citadas as úlceras de membros inferiores ou em pé de pacientes diabéticos, complicações de feridas cirúrgicas e lesão por pressão³. Estudo realizado em Barcelona no ano de 2013 com mais de 15.000 participantes identificou uma prevalência de 10,3% de feridas crônicas⁴. A revisão sistemática de Martinengo *et al.*, (2019) apresenta a prevalência de úlceras crônicas de perna na população geral estimada em 1,5 por 1.000 pessoas em uma perspectiva global. A incidência das úlceras podem aumentar com o decorrer da idade, caracterizando assim, que a prevalência aumente na medida do envelhecimento populacional⁵.

Diante do envelhecimento populacional e comorbidades associadas, as úlceras crônicas continuam a ser um desafio clínico, social e econômico⁶. As úlceras localizadas nos membros inferiores podem ser classificadas de acordo com sua etiologia como úlceras venosas, arteriais, diabéticas e outras menos frequentes. Para essa classificação, o exame físico auxilia na orientação do diagnóstico, por meio da avaliação da localização da ferida, tamanho, profundidade, exsudato e tipo de tecido, palpação dos pulsos e mensuração do índice tornozelo braquial (ITB)⁷.

Independente da classificação da úlcera nos membros inferiores estudos apresentam o impacto negativo e declínio que pode refletir em relação a função física, psicossocial, qualidade de vida e financeira.

1.2 Úlcera venosa

A úlcera venosa (UV) é o estágio mais avançado da doença venosa crônica e a causa mais comum das úlceras de membros inferiores, representando 70% dessas úlceras. Estima-se que a UV afeta entre 2% a 7% da população mundial⁸, apresentando prevalência anual de 1,7% entre as pessoas com 65 anos de idade ou superior⁹.

Dentre os fatores de risco para o desenvolvimento de UV estão citados a idade igual ou superior a 55 anos, história familiar de insuficiência venosa crônica, índice de massa corporal elevado, história de embolia pulmonar ou trombose venosa, doença esquelética ou articular dos membros inferiores, maior número de gestações, histórico familiar de úlceras de tornozelo, inatividade física, histórico prévio de úlceras nos membros inferiores e lipodermatoesclerose grave¹⁰.

O prognóstico das UV é ruim, além da cicatrização demorada é comum o surgimento de úlceras recorrentes. Estudo apresenta mau prognóstico para cicatrização quando a duração da úlcera se apresenta superior a três meses, comprimento da úlcera de 10 cm, presença de doença arterial associado à doença venosa nos membros inferiores, idade avançada do paciente e índice de massa corporal elevado¹¹. Estudo de coorte com 50 pacientes adultos acompanhados após a cicatrização da UV, no período de 10 anos, mostrou que 62% apresentaram recidiva da lesão¹².

As UVs ocasionam além do impacto socioeconômico, grande repercussão na piora da qualidade de vida, reduzindo a capacidade de participação social e desenvolvimentos de atividades profissionais das pessoas acometidas⁸. São responsáveis por perda da capacidade funcional, limitação nas atividades diárias, isolamento social, discriminação e rejeição do parceiro, problemas emocionais, também prejuízos econômicos para a família, instituições de saúde e para o sistema previdenciário¹³.

Os pacientes com UVs podem ser submetidos a tratamentos associados a medicamentos tópicos, curativos e terapias de compressão. As opções de tratamento clínico de padrão ouro incluem o uso de bandagens de compressão ou meias, auxiliando no retorno venoso. São exemplos a terapia compressiva com faixa elástica multi ou unicamadas, meias elásticas de alta compressão em forma de kits e terapia inelástica como a Bota de Unna (composta por gaze inelástica impregnada com óxido de zinco). Revisão sistemática identificou tempo mais curto da cicatrização de UVs em pessoas que usam bandagens ou meias de compressão em comparação com aquelas que não usam compressão¹⁴.

Nesse sentido, a terapia compressiva com faixas elásticas, bota de Unna, meias elásticas, entre outras, apresentam um papel fundamental durante o tratamento realizando a retenção, suporte ou compressão local, são diferenciadas de acordo com a quantidade de força necessária para aplicação no membro, desempenhando um efeito positivo na

contribuição do tratamento como um todo¹⁵. Assim, existem diferentes tipos de compressões com o objetivo tratar úlceras e após a cicatrização e reduzir o risco de recorrência da lesão¹⁴.

1.3 Microbiologia das úlceras crônicas e biofilmes

Tanto as úlceras agudas quanto as crônicas podem ser contaminadas, independentemente de sua etiologia por microrganismos que podem ser provenientes de secreções endógenas, curativos e do próprio ambiente. Nesse sentido a colonização irá ocorrer quando as bactérias estão se replicando no leito da úlcera, mas não causam danos ao hospedeiro. Contudo, o ambiente está suscetível às infecções bacterianas, que ocorre quando há aumento da carga microbiana na superfície da úlcera (colonização crítica, infecção superficial/local), onde os níveis de citocinas pró-inflamatórias dificultam a cicatrização, causando dificuldades no tratamento realizado, deterioração do tecido de granulação e exsudato em excesso. Além disso, também pode ocorrer a penetração das bactérias nos tecidos peri-úlcera (infecção profunda), nessa situação caracteriza a replicação de bactérias na ferida associada a danos ao hospedeiro, na qual as bactérias na ferida ultrapassam a capacidade de defesa imunológica, incluindo sinais de infecção clássica tais como eritema, edema, aumento da temperatura, dor na região perilesional e febre^{16,17}.

Um estudo sobre a prevalência da microbiota em úlceras agudas e crônicas, identificou *Staphylococcus aureus* em 23,3% das úlceras e *Pseudomonas aeruginosa* em 14,8%. *S. aureus* foi encontrado mais frequentemente em pacientes com úlceras crônicas (48,8%) do que em agudas (9,5%), enquanto o *S. epidermidis* foi encontrado predominantemente em úlceras agudas (17,9%)¹⁸. Outro estudo recente encontrou a diversidade bacteriana nas úlceras crônicas de diferentes etiologias. Os patógenos mais comuns identificados foram *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Enterobacterales* e *Enterococcus spp*¹⁹.

Existem várias discussões apresentadas a partir do século XXI sobre a influência de formação de comunidades bacterianas complexas denominadas de biofilmes, que contribuem para o atraso na cicatrização das úlceras crônicas, considerando a causa isolada mais importante que influencia na cicatrização tardia^{20,21,22}.

Dependendo do ambiente da úlcera, pode haver a formação de diferentes tipos de biofilmes. Como observado na Figura 1, na presença de fatores predisponentes no hospedeiro, a formação do biofilme inicia-se quando uma bactéria na sua forma planctônica adere a uma superfície exposta, que pode ser biótica ou abiótica (etapa 1). Posteriormente, os micro-organismos ligam-se entre si e aderem de maneira irreversível (etapa 2). Depois,

começam a se proliferar, ativando o quórum *sensing* (um processo pelo qual as bactérias podem regular o metabolismo e consequentemente, responder às flutuações na densidade populacional das células), formando microcolônias de biofilme (etapa 3). O biofilme cresce e se diferencia, culminando em uma comunidade de biofilme maduro, apresentando características estruturais (etapa 4). Há formação de uma matriz composta por água e substâncias poliméricas como polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. O biofilme maduro entra em processo de dispersão, ou seja, ocorre uma desestabilização do biofilme devido a fatores ambientais e por conseguinte, há o destacamento de células ou de microcolônias (etapa 5).^{19,23,24} A dispersão pode resultar na colonização de novos nichos e consequentemente, em novos sítios de infecção com biofilme¹⁹.

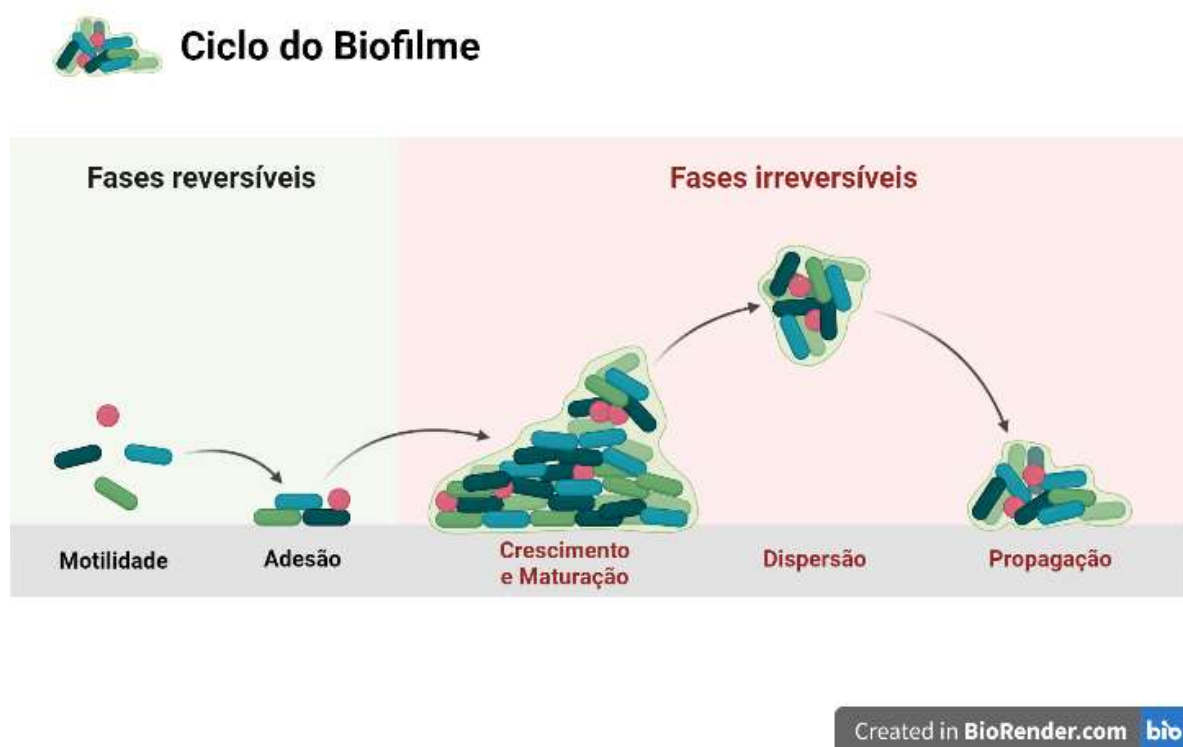


Figura 1. Ciclo do Biofilme. BioRender.

Os biofilmes estão presentes em várias infecções crônicas da mucosa incluindo as do trato urinário, periodonto, trato respiratório e em feridas crônicas²⁵, prejudicando o processo de cicatrização^{17,26}. Os mecanismos desse fenômeno ainda não estão totalmente esclarecidos, porém acredita-se que o estado inflamatório crônico induzido pela presença do biofilme e a baixa tensão de oxigênio no ambiente da ferida são fatores que dificultam a cicatrização²⁷.

Estudo usando microscopia de varredura eletrônica, mostrou que 60% das úlceras crônicas apresentou biofilme, em comparação com apenas 6% das úlceras agudas²⁸.

As úlceras crônicas oferecem um ambiente ideal para a formação do biofilme devido à redução da resposta imune do hospedeiro na área da lesão, caracterizada pela presença de

tecidos não viáveis, auxiliando na adesão microbiana²⁹. Desta forma contribuem para dificuldade de cicatrização, representando um importante fator de virulência na patogênese das úlceras crônicas³⁰. Nas camadas mais profundas do biofilme, as bactérias crescem lentamente devido à deficiência de nutrientes, fenômeno que contribui para a resistência das bactérias aos antibióticos^{13,19}. Os biofilmes se desenvolvem em feridas crônicas em 10 horas e podem persistir enquanto a ferida permanece aberta³¹.

As úlceras crônicas apresentam diferentes tipos e quantidade de microrganismos¹⁶ o que dificulta a resposta aos tratamentos com antissépticos e antibióticos³². Todas as UV são colonizadas com bactérias, apresentando como um nicho ecológico ideal para estabelecimento e garantia de sobrevivência destas bactérias. Assim, algumas UV podem evoluir para infecção superficial, também conhecida como colonização crítica, continuando a desenvolver infecção enquanto aberta³³. Uma boa compreensão das complexidades do ambiente microbiano-hospedeiro deve ser aprofundada para orientar um diagnóstico e tratamento eficiente para a UV com infecção superficial⁹.

1.4 Intervenções terapêuticas para combate de biofilmes em úlceras crônicas

O tratamento de feridas crônicas representa um grande desafio para os profissionais de saúde. Nesse sentido, durante o tratamento de uma úlcera que não cicatriza em tempo esperado, diversas intervenções podem ser adotadas concomitantemente. As mais citadas para manejo dos biofilmes em úlceras crônicas são os curativos com prata, iodo, Polihexametileno de biguanida (PHMB), mel, desbridamento cirúrgico superficial ou a conjugação de diversas terapias. Porém nenhum método apresenta ser completamente eficaz para os biofilmes^{21,34,35} e faltam evidências científicas para afirmar a melhor forma de sua remoção do leito de úlceras crônicas.

As coberturas com prata são difundidas na prática clínica para o controle da infecção superficial. Em estudo de revisão da literatura contendo resultados de estudos clínicos, *in vitro* e *in vivo*, apresenta o uso de vários curativos com prata para o tratamento de úlceras e especialmente no manejo de úlceras criticamente colonizadas por bactérias formadoras de biofilme como: espuma impregnada de prata, hidrofibra com prata e fibra gelificante com prata³⁶. Em uma meta-análise sobre o uso da prata para tratamento de biofilmes, mostrou eficácia do seu uso em tempo limitado, inferior a 14 dias, apresentando efeitos antimicrobianos, melhora da qualidade de vida e também uma boa relação custo-eficácia no tratamento³⁷.

Quanto à utilização de iodo em feridas crônicas, há estudos com o cadexômero de iodo, descrito como um antisséptico eficaz, pois atua contra a produção de glicocálix ou material polimérico das bactérias, atuando diretamente na estrutura do biofilme. Sua ação antimicrobiana se faz por meio do rompimento da membrana lipídica e inibição da síntese proteica bacteriana. Descrito como não tóxico para os fibroblastos³⁸. Recente revisão sistemática com metanálise encontrou redução significativas na área da ferida, no exsudato, pus/detritos, esfacelo, biocarga e infecção em feridas crônicas tratadas com cadexômero iodine comparado com tratamento padrão³⁹.

Dentre os antissépticos descritos na literatura utilizados no manejo do biofilme, a PHMB é utilizado na prevenção e combate de infecção superficial das úlceras, auxiliando na limpeza contribuindo para as condições favoráveis ao processo de cicatrização. Ela tem atividade biocida de amplo espectro, provocando a lise celular, impulsionando na membrana um stress osmótico⁴⁰.

O mel é destacado pelo seu efeito antimicrobiano e antiinflamatório, interagindo com o exsudato da úlcera, onde o peróxido de hidrogênio é produzido, elimina a água das células, causando lise e promove o desbridamento autolítico, contribuindo no processo de cicatrização, mantendo as úlceras úmidas, permitindo a migração epidérmica e estimulação de citocinas inflamatórias^{41,42}.

É descrito falta de eficácia dos antibióticos tópicos e sistêmicos no combate ao biofilme, e isto pode estar relacionado à penetração reduzida ou incompleta destes agentes nesta estrutura bacteriana³², além da reformulação rápida do biofilme na úlcera⁴³.

Uma das estratégias descritas como mais eficaz contra o biofilme consiste na sua remoção cirúrgica da superfície da úlcera, ou seja, desbridamento cirúrgico superficial^{9,44}. Entretanto, segundo o estudo de Wolcott *et al.*, o biofilme pode retornar a sua formação após dois ou três dias, mesmo que seja realizado desbridamento agudo. Contudo, a remoção do biofilme contribuirá para a cicatrização das úlceras⁴⁵. A remoção de tecido desvitalizado por meio do desbridamento cirúrgico tem sido utilizado buscando a redução da carga microbiológica e acelerar a cicatrização de feridas. Outras formas de desbridamento como autolíticos (hidrogéis, alginato de cálcio e hidrocoloides) e enzimáticos (colagenase e papaína), não são descritos como agentes que atuam nos biofilmes⁴⁶.

1.5 Justificativa para o presente estudo e hipótese

Estudo clínico encontrou que, o desbridamento cirúrgico de feridas crônicas removeu comunidades de biofilme dos leitos de feridas, entretanto o biofilme começa a ressurgir dois

dias após o desbridamento inicial e grande número de biofilmes maduros foram identificados três dias após o desbridamento⁴⁷. O desbridamento atua no combate do biofilme de úlceras crônicas, mas são necessárias outras estratégias para evitar sua reformação para garantir o sucesso terapêutico.

A resistência de bactérias produtoras de biofilme é um problema crucial no manejo e tratamento de feridas crônicas. Desbridamento cirúrgico superficial e curativos a base de prata são linhas de tratamento descritas para combate de biofilme⁴⁶. Entretanto, não há estudos que avaliaram as duas intervenções associadas para manejo da reformação do biofilme, realizando avaliação microbiológica padrão ouro para análise de biofilme. A identificação do biofilme é relevante para a aplicação das melhores intervenções no tratamento das úlceras crônicas como as UVs, procurando promover a cicatrização.

Nesse sentido, considerando a melhor forma de tratamento para o controle da colonização crítica em UV, realizou o seguinte questionamento clínico: O desbridamento cirúrgico superficial associado ao curativo de hidrofibra com prata controla a colonização crítica quando comparado com o curativo de collagenase em UVs?

Baseado em literatura de que o desbridamento cirúrgico promove redução da carga bacteriana e combate do biofilme⁹, entretanto ocorre sua reformação após 72 horas⁴⁷, há necessidade de intervenções que impeçam sua reformação por meio de ação nas bactérias que colonizam as úlceras crônicas.

Como já comentado anteriormente, produtos que promovem desbridamento enzimático como a collagenase não é descrito com ação anti-biofilme. A collagenase é caracterizada como uma enzima derivada da bactéria *Clostridium histolyticum* e tem ação efetiva e seletiva por agir no colágeno presente no tecido necrótico sem prejudicar o tecido de granulação. Portanto, ela é indicada como manutenção após desbridamento cirúrgico⁴⁸. Devido ao uso significativo de collagenase na prática clínica, sua utilização como controle nos estudos comparativos permite a comparação da intervenção teste com um tratamento usual, que se realiza na rotina dos serviços de atenção à saúde. Desta forma, a escolha da collagenase como grupo comparativo neste estudo foi com a intenção de utilizar um tratamento com ação desbridante, muito utilizado na prática clínica, mas sem ação antimicrobiana para comparar com uma intervenção com ação antibacteriana como a hidrofibra com prata, por ser descrito como uma importante terapêutica contra as bactérias formadoras de biofilme³⁴. A hidrofibra é composta por fibras de carboximetilcelulose com capacidade de absorver exsudato e a prata é um produto antisséptico e anti-inflamatório com largo espectro antibacteriano^{49,50,51}. Tanto os pacientes do grupo intervenção quanto do grupo controle receberão orientações de medidas anti-estase e terapia compressiva.

Portanto a hipótese do presente estudo é que o desbridamento cirúrgico superficial associado ao curativo de hidrofibra com prata diminuirá a carga bacteriana e a reformação do biofilme com consequente melhoria das condições clínicas da UV e cicatrização, não ocorrendo o mesmo quando realizado o desbridamento cirúrgico superficial associado ao curativo de collagenase.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Primário

Avaliar a ação do curativo hidrofibra com prata no controle da colonização crítica (infecção superficial) e da formação do biofilme por inibição do crescimento bacteriano comparado ao curativo com collagenase, ambos após desbridamento cirúrgico superficial em pacientes com UV que utilizaram estas intervenções por 30 dias.

2.2 Objetivos Secundários

- ✓ Verificar a presença de *S. aureus*, *S. epidermidis* ou *P. aeruginosa* antes e após o desbridamento associado ao curativo hidrofibra com prata e collagenase das UV;
- ✓ Determinar a capacidade de produção de biofilme por essas bactérias;
- ✓ Verificar a clonalidade das cepas isoladas nos tempos iniciais e finais de tratamentos, por meio da eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE);
- ✓ Descrever a evolução clínica (taxa de cicatrização e diminuição da área ulcerada) após o desbridamento associado ao curativo hidrofibra com prata e o curativo com collagenase

3 MÉTODO

3.1 Tipo de Estudo

Ensaio clínico randomizado-controlado, paralelo, aberto, com dois braços paralelos. Teve o registro brasileiro de ensaios clínicos (ReBEC - RBR-4kkq2h).

3.2 Local do Estudo,

Foi realizado no Ambulatório de Úlceras Crônicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP).

3.3 População e critérios de elegibilidade

Os participantes foram os pacientes adultos que atenderam a todos os critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão seguintes:

Critérios de Inclusão:

- Ter idade maior ou igual de 18 anos;
- Apresentar UV crônica (úlceras abertas superiores a 6 semanas) com sinais clínicos de colonização crítica segundo os critérios da regra mnemônica NERDS⁵² se houver pelo menos dois dos seguintes achados:
 1. Úlceras que não estão cicatrizando (N= Nonhealing wounds);
 2. Aumento da exsudação (E= Exudative wounds);
 3. Tecido de granulação de superfície de úlcera vermelho e sangrento (R= Red and bleeding wound surface granulation tissue);
 4. Detritos caracterizado por tecido necrótico amarelo ou preto na superfície da ferida (D= Debris -yellow or black necrotic tissue on the wound surface)
 5. Cheiro ou odor desagradável da úlcera (S= Smell or unpleasant odor from the wound)
- Concordância com os procedimentos propostos no estudo (desbridamento cirúrgico superficial no início do tratamento, curativo hidrofibra com prata ou colagenase e uso de bandagem elástica de alta compressão);
- Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (paciente ou responsável) – Apêndice I.

Critérios de exclusão:

- Úlceras de outras etiologias (doença arterial periférica, causas hematológicas, neoplásicas, infecciosas, etc);

- Úlceras infectadas, ou seja, quando associada à erisipela, celulite ou linfangite devido à necessidade de terapia antibiótica sistêmica;
- Ter história de hipersensibilidade aos tratamentos propostos;
- Ter UV associada à doença arterial periférica que será caracterizada quando o índice sistólico tornozelo-braço (ITB) for menor do que 0,8 e/ou ausência de pulsos distais, principalmente tibioso.

Os pacientes foram avaliados clinicamente e com aplicação de roteiro (Apêndice II) para caracterização das UV.

Critérios de descontinuação:

Após a inclusão no estudo, o participante foi descontinuado se houvesse um dos seguintes critérios:

- Retirada do consentimento.
- Presença de infecção associadas à(s) úlcera(s) (erisipela, celulite ou linfangite), durante seguimento. Nestes casos o sujeito de pesquisa foi tratado adequadamente conforme a rotina do serviço.
- Utilização de outros métodos que não estão preconizados neste protocolo.
- Pulsos distais não palpáveis e/ou Índice tornozelo-braquial (ITB) $< 0,8$ durante o seguimento.
- Eventos adversos locais clinicamente significantes (dor de forte intensidade, eczema, abertura de nova úlcera), a critério de investigador.

3.4 Delineamento do Estudo, plano de tratamento e desfechos

Inicialmente foi realizada a medida da área de todas as úlceras dos participantes incluídos no estudo no tempo basal (T0). Posteriormente foi realizada a limpeza da úlcera com soro fisiológico (SF) 0,9%. Logo após houve a coleta de material por meio de swab do leito da úlcera para análise microbiológica. Na sequência, foi feito o desbridamento cirúrgico superficial do leito da(s) úlcera(s) em ambos os grupos. Este procedimento foi realizado com anestesia tópica local (creme contendo lidocaína 4%) mantido sob oclusão por 30 min. Após esse tempo foi realizado o desbridamento, por médico dermatologista, com cureta em todo o leito ulcerado.

Após o desbridamento, os participantes foram randomizados em dois grupos. O grupo 1 ou grupo Hidrofibra com prata (HAg) foi composto por participantes tratados com o curativo de hidrofibra com prata (AQUACEL® Ag⁺ Extra™), na forma de placa com troca

quando atingisse a sua saturação (aproximadamente quatro dias). No grupo 2, os participantes foram tratados com curativo de Colagenase (Col) não associada a antibióticos (Kollagenase®). A apresentação da colagenase foi em pomada e a quantidade de aplicação dependia do tamanho da úlcera, mas devia ser em quantidade suficiente para cobrir todo leito ulcerado com uma camada mínima de 2mm e após cobertura secundária com gaze, com troca uma vez ao dia.

Em ambos os grupos foi associada a terapia com faixa elástica compressiva (Surepress®- figura 2), com aplicação uma vez ao dia (pela manhã e retirada ao final do dia). Este era um sistema de compressão composto por única camada, com compressão em torno de 25 a 35 mmHg no tornozelo.



Figura 2. Faixa elástica compressiva que foi utilizada no estudo.

Fonte: Disciplina de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.

Todos os participantes ou cuidadores receberam as seguintes orientações para cuidados com as úlceras em domicílio (Apêndice III).

O período de 30 dias após o início das intervenções foi escolhido, uma vez que o objetivo principal foi avaliar a ação dos curativos no controle da colonização crítica e da formação do biofilme, não havendo necessidade de maior tempo de acompanhamento, pois o objetivo primário não foi avaliação da cicatrização total.

Após 30 dias de acompanhamento (T30), os dois grupos foram reavaliados e foi realizada a medida da área de todas as úlceras e nova coleta de material para análise microbiológica por meio de *swab*.

Foram avaliados os seguintes desfechos no T30:

- Primários
 - Taxa de úlceras sem sinais de infecção superficial (ou colonização crítica) segundo os critérios clínicos da regra mnemônica NERDS⁵²;
 - Análises microbiológicas:
 - Taxa de úlceras com diminuição da carga bacteriana;
 - Taxa de úlceras com bactérias produtoras de biofilme;
 - Taxa de úlceras com mudança da identidade bacteriana;
- Secundários
 - Melhora clínica das UV avaliado pela escala de PUSH⁵³;
 - Diminuição da área da úlcera pelo método planimétrico;
 - Taxa de cicatrização avaliado clinicamente pela observação da epitelização total sem presença de crostas no local da UV.
 - Eventos adversos locais relacionados às intervenções.

Todos os desfechos foram avaliados por examinador cego, ou seja, sem conhecimento do grupo que o participante foi randomizado.

3.5 Procedimentos

3.5.1 Avaliação da área das úlceras

As áreas das UV foram analisadas antes do início do tratamento (T0) e no 30º dia (T30). Para a mensuração da área, cada úlcera foi analisada empregando o método planimétrico. As úlceras foram fotografadas com uma régua adjacente à sua borda para criar um referencial externo. Por meio do software *Image J 1.37v* foi estabelecido a relação do comprimento (pixels/mm) individualizada para cada foto e realizado o traçado manual do perímetro das úlceras calculando a área em pixel e transformada em cm² (figura 3). Para cada úlcera este procedimento foi realizado três vezes, considerando como resultado a média das áreas (Apêndice IV).



Figuras 3: Mensuração da área da úlcera por meio do *software Image J 1.37v*.

Fonte: Disciplina de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.

3.5.2 Avaliação das características dos leitos das UV

A fim de realizar avaliação e registro das características dos leitos das UV, no início do tratamento (T0) e no 30º dia (T30) das intervenções, foi realizada aquisição da imagem fotográfica com o paciente deitado.

3.5.3 Avaliação clínica de infecção superficial das UV

A presença de sinais clínicos de infecção superficial (ou colonização crítica) foi avaliada, no início do tratamento (T0) e no final (T30), segundo os critérios baseados na regra mnemônica NERDS⁵² (Apêndice 1), conforme descrito nos critérios de inclusão.

3.5.4 Avaliação da melhora clínica das UV

Para a avaliação da evolução do processo cicatricial da úlcera, no início (T0) e no 30º dia (T30) de tratamento, foi empregada a escala de PUSH (*Pressure Ulcer Scale for Healing*)⁵³ que considera três parâmetros para avaliação do processo de cicatrização da ferida (Apêndice V).

O primeiro parâmetro caracteriza a área da úlcera considerando o maior comprimento (sentido céfalo caudal) *versus* a maior largura (em linha horizontal da direita para a esquerda) da úlcera em cm². Conforme a área obtida os escores variam de 0 a 10.

No segundo parâmetro avalia-se a quantidade de exsudato presente, avaliada imediatamente após a remoção da cobertura e antes da limpeza com qualquer solução.

Classificada como ausente, pequena, moderada e grande, que correspondem a escores de 0 (ausente) a 3 (grande).

Por fim, no terceiro parâmetro é avaliado a aparência do leito da úlcera, definida como o tipo de tecido prevalente, sendo especificada como: tecido necrótico, esfacelo, tecido de granulação, tecido epitelial e ferida fechada ou recoberta. Esses tecidos correspondem aos escores 0 (ferida fechada), 1 (tecido epitelial), 2 (tecido de granulação), 3 (esfacelo) e 4 (tecido necrótico).

Ao serem somados os três parâmetros, irá gerar um escore total, com variação possível é de 0 a 17. Escores maiores indicam piores condições da úlcera. Medindo apenas três variáveis, o instrumento PUSH gera escores que, em sua magnitude e direção, podem descrever as condições e a evolução da cicatrização das úlceras. O instrumento em questão foi criado para o acompanhamento da evolução de úlceras por pressão, mas no Brasil foi adaptado e validado para acompanhamento de úlceras de perna^{53,54,55}.

3.6 Análises microbiológicas

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia do Instituto de Biociências da Unesp - campus Botucatu (IBB).

3.6.1 Coleta das amostras

Para coleta das amostras, as úlceras foram irrigadas com solução salina a 0,9% sob pressão mecânica. Um molde de gaze estéril com uma abertura central predeterminada de 1 cm² foi colocado no leito ulcerado que havia aparência de mais tecidos inviáveis. O swab foi umedecido em solução salina estéril (0,9%), sendo friccionado por todo o campo exposto (figura 4). Após, o swab foi acondicionado em tubo com 3 mL de solução salina estéril (0,9%), que foi colocado sob refrigeração e imediatamente encaminhado para as análises microbiológicas.



Figura 4: Coleta com swab na úlcera colonizada em uma área de 1 cm².

Fonte: Disciplina de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP.

3.6.2 Identificação das espécies

Neste estudo foram escolhidas para serem analisadas as bactérias mais prevalentes e produtoras de biofilme em UV citadas na literatura, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*⁵⁶. As outras bactérias que apareceram nas culturas foram apenas descritas se presentes e sua carga, mas não foram avaliadas quanto a produção de biofilmes e identidade bacteriana entre T0 e T30.

3.6.2.1 Identificação de *S. aureus* e *S. epidermidis*

Cada swab foi submetido a 3 minutos de vortex, para a liberação das bactérias nos 3 ml de salina e um volume de 100 µl foi semeado na superfície de uma placa de ágar sangue (5% sangue desfibrinado de carneiro) e ágar manitol, espalhados com o auxílio de uma alça em L (técnica de spread) (Figura 5). As placas foram incubadas a 35°C, por até 48 horas e após esse período, colônias características de cada espécie foram contadas, estocadas em ágar tripticase soja (TSA) e submetidas a testes de triagem como coloração de Gram (cocos Gram positivos, em arranjo de cacho de uva), catalase e coagulase em tubo⁵⁷. A seguir, a identificação definitiva foi realizada com o auxílio do kit API Staph (BioMérieux). Para o cálculo do número de UFC/cm², o número de colônias confirmadas foi multiplicado por 10 (inóculo de 100 µl) e depois por 3 (total de 3 ml no tubo do swab).

Também foi realizado a identificação do *S. aureus* por amplificação por PCR para confirmar a presença do estafilococo espécie-específico gene nuclease (nuc; CRL-AR, 2009)⁵⁷.

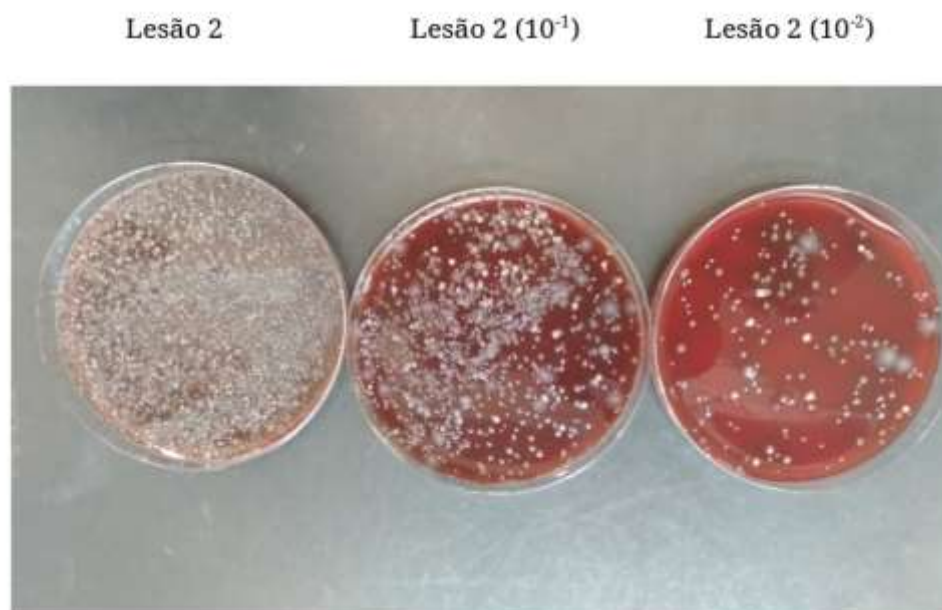


Figura 5: Exemplo de semeadura na superfície de uma placa de ágar sangue.

Fonte: Laboratório de microbiologia do Instituto de Biociências da Unesp - campus Botucatu ([IBB](#)).

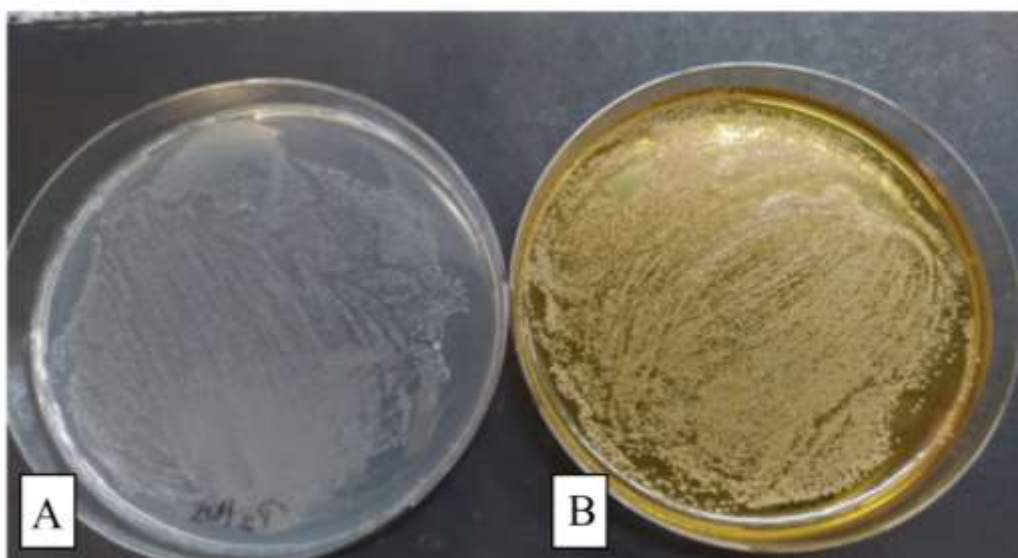


Figura 6A: Exemplo de semeadura na superfície de uma placa de ágar cetrimide. **6B:** Exemplo de semeadura na superfície de uma placa de ágar manitol.

Fonte: Laboratório de microbiologia do Instituto de Biociências da Unesp - campus Botucatu ([IBB](#)).

3.6.2.2 Identificação de *Pseudomonas aeruginosa*

Cada swab foi submetido a 3 minutos de vortex, para a liberação das bactérias nos 3 ml de salina e um volume de 100 µl foi semeado na superfície de uma placa de ágar sangue (5% sangue desfibrinado de carneiro) e o mesmo volume, em uma placa de ágar Cetrimide, espalhados com o auxílio de uma alça em L (técnica de spread) (Figura 6A e 6B). As placas

foram incubadas a 35°C, por até 48 horas e após esse período, colônias características em cada placa foram contadas, estocadas em ágar tripticase soja (TSA) e submetidas a testes de triagem como coloração de Gram (bastonetes Gram negativos), oxidase e crescimento à 42°C⁵⁷. A seguir, a identificação definitiva foi realizada com o auxílio do kit API 20 NE (BioMérieux). Para o cálculo do número de UFC/cm², o número de colônias confirmadas foi multiplicado por 10 (inóculo de 100 µl) e depois por 3 (total de 3 ml no tubo do swab)⁵⁸.

Também foi realizada a identificação da *P. aeruginosa* por amplificação por PCR e a confirmação foi realizada pela presença do gene *oprI*^{57,59}.

3.6.3 Produção de biofilme em microplaca de poliestireno

Cada cultura de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, crescida em BHI a 35°C/24h, foi diluída a, aproximadamente, 1,5x10⁸ UFC (0,5 escala de MacFarland), com o auxílio do Densicheck (Biomeriêux), utilizando-se BHI + 0,5% de glicose. Uma alíquota de 200 µL foi semeada em quadruplicata, em microplaca de 96 poços. Após incubação de 48 horas, a placa foi lavada três vezes, com PBS (pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com violeta cristal 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, para a remoção do corante, a placa seca em temperatura ambiente, foi colocada em um leitor de ELISA, para a leitura da densidade óptica (D.O) (Babsystems, MultiSkan EX), em 570 nm. BHI não inoculado foi utilizado como controle negativo das reações. O controle positivo de *P.aeruginosa* foi a ATCC 9027 e dos estafilococos foi *S. epidermidis* ATCC 35983.

A partir da média das quatro repetições (D.O.) e de acordo com a relação entre a D.O. (amostra em teste) e D.O.c (controle negativo), as amostras foram classificadas em não produtoras, fracas, moderadas ou fortes produtoras de biofilme, segundo Stepanovic *et al*⁶⁰. (Quadro 1).

Relação	Interpretação
$D.O. \leq D.O.c$	não produtor
$D.O.c < D.O. \leq (2 \times D.O.c)$	fraco produtor
$2 \times (D.O.c) < D.O. \leq (4 \times D.O.c)$	moderado produtor
$4 \times (D.O.c) < D.O$	forte produtor

Quadro 1. Classificação das cepas em relação à produção de biofilme.

3.6.4 Eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel de Eletroforese* - PFGE)

A tipagem molecular pela técnica PFGE foi realizada para as bactérias (*S. aureus*, e *P. aeruginosa*) que foram da mesma espécie em uma determinada úlcera no T0 e T30.

3.6.4.1. Parâmetro do PFGE para *S. aureus*

Para as cepas de *S. aureus*, foi usada a metodologia utilizada do Pulsenet⁶¹. Brevemente, cada cepa foi incubada em caldo BHI a 35°/24 horas para a confecção dos *plugues*, em agarose *low melting* e lisostafina (100µg/mL). Após incubação overnight a 37°C, uma porção de, aproximadamente, 2 milímetros de cada *plague* foi cortada para a digestão com a enzima de restrição SmaI Fast (Thermo Scientific), durante 6 minutos. Após esse tempo, as porções dos *plugues* foram distribuídas em gel de agarose *low melting* 1% para a corrida no Chef Mapper com os parâmetros de: pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 40 segundos, voltagem de 6V/cm e ângulo de 120°, no total de 21 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo e analisado e fotografado em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha Esasy FC Software – AlphaInotech Corporation). Como marcador de pares de base, foram utilizados fragmentos de DNA da *S. aureus* NTCT 8.325⁶².

3.6.4.2. Parâmetro do PFGE para *P. aeruginosa*

Para as cepas de *P.aeruginosa*, foi usada a metodologia para Gram negativos de Selim *et al*⁶³.

Cada isolado de foi semeado em placa de ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid), incubada a 35 °C/24 h. Em seguida, foram preparadas as suspensões bacterianas em tampão de suspensão celular (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0) de modo a obter densidade óptica de 0,8 a 1,0 em espectrofotômetro a 610 nm. Após esse procedimento, 200 µL da suspensão celular foram transferidos para um tubo de microcentrífuga, adicionado de 10 µL de proteinase K (20 mg/mL), 5 µL de lisozima (40 mg/mL) e 200 µL de agarose ultrapura a 1,2 % (Bio-Rad) em solução de Tris-EDTA (TE, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A mistura foi colocada em moldes para confecção dos *plugs*. Após solidificação, os *plugs* foram transferidos em solução de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0 + 1 % de sarcosil + 0,1 mg/mL Proteinase K) onde foram mantidos nessa solução a 54 °C/2 h em agitação constante a 120 rpm. Após esse período, os *plugs* de agarose foram lavados duas vezes com água ultrapura a 50 °C/15 min e mais quatro vezes com tampão TE a 50 °C/15 min, sendo estocados em tampão TE a 4 °C.

Para a digestão do DNA, uma fatia de aproximadamente 2 mm de largura foi incubada a 37 °C/*overnight* com 30 U de SpeI juntamente com o tampão apropriado. Em seguida, os fragmentos dos *plugs* foram colocados em gel de agarose ultrapura a 1 % em

tampão TBE (0,5x) e inseridos na cuba do equipamento Chef Mapper (Bio-Rad) nas condições: pulso inicial: 2 s, pulso final: 40 s, voltagem: 6 V/cm, ângulo: 120°, tempo: 20 h

Ao término da corrida, os géis foram corados em 300 mL de água destilada com 30 µL de brometo de etídio 1 % (Sigma) por 30 min, seguido por uma lavagem de 30 min com água destilada, e fotografado em analisador de imagens Alphamager 2200. Os padrões de bandas de DNA em gel foram analisados utilizando o software Bionumerics (versão 7.6), para determinar o parentesco dos isolados e o agrupamento foi realizado pelo método de clusterização UPGMA usando o coeficiente de Dice. Como marcador de pares de base, foram utilizados fragmentos de DNA da *Salmonella enterica subsp. enterica serovar* Braenderup H9812 (ATCC® BAA664™).

Todas as etapas anteriormente mencionadas estão descritas na figura 7.

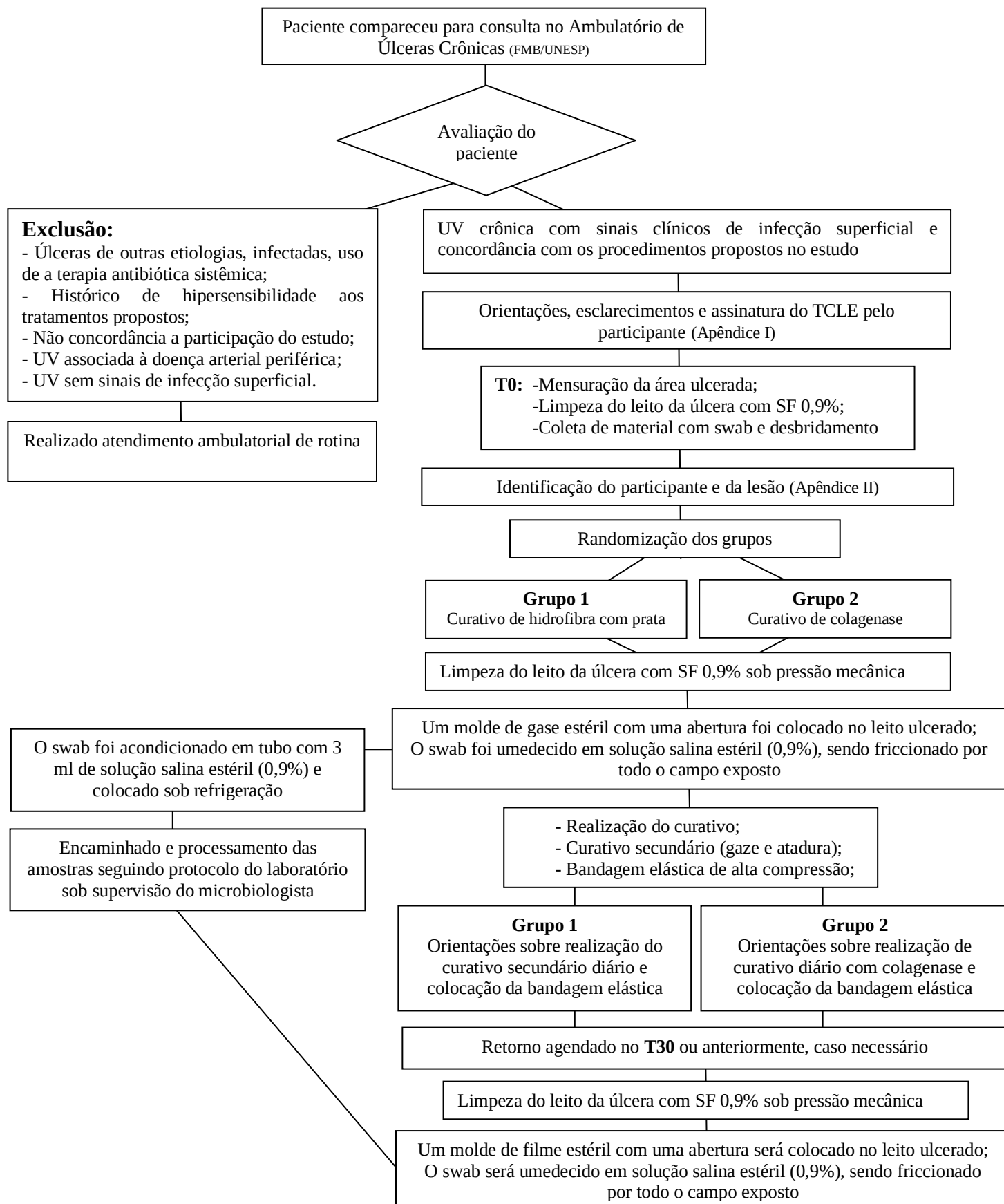


Figura 7. Fluxograma da coleta de amostra e encaminhamento ao laboratório

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.7 Variáveis

- ✓ Idade (anos)
- ✓ Sexo (Masculino e Feminino);
- ✓ Tempo de úlcera ativa;
- ✓ Número de úlceras;
- ✓ Membro acometido;
- ✓ Localização da úlcera (medial da perna, lateral da perna; pré-tibial; face anterior e posterior da perna; dorso do pé; medial do pé; lateral do pé);
- ✓ Área da úlcera (cm²);
- ✓ Leito da úlcera (bom tecido de granulação, tecido de granulação de coloração vermelho opaco e friável, esfacelo, necrose);
- ✓ Pele periúlcera (sem alterações, dermatite ocre, lipodermatoesclerose, eczema);
- ✓ Exsudação (serosa, purulenta e/ou sanguinolenta);
- ✓ Quantidade da exsudação (pequena, média ou grande);
- ✓ Dor relacionada à úlcera (conforme a Escala Visual Numérica);
- ✓ Sinais de infecção superficial (segundo NERD);
- ✓ Identificação da microbiota;
- ✓ Análises de biofilme.

3.8 Análise dos Dados

3.8.1 Tamanho amostral

Inicialmente assumimos a hipótese de que 20% das UV permaneceriam com infecção superficial no grupo com hidrofibra e 60% no grupo com Colagenase e considerando 80% de poder estatística e nível de significância bicaudal de 95%, foram necessárias 27 UV por grupo de intervenção.

3.8.2 Critérios de randomização e de ocultação da alocação

O protocolo de aleatorização foi realizado utilizando o Software Rv 3.1.2 e foi por participante e não por úlcera. A lista de randomização permaneceu sob os cuidados de um indivíduo alheio a seleção clínica dos participantes para garantir a ocultação da alocação. A Randomização foi realizada no T0 e o participante pode ser alocado para o grupo colagenase ou grupo hidrofibra com prata. Os participantes foram selecionados a partir do Ambulatório de Úlceras Crônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP) no período da pesquisa, conforme os critérios para participação do estudo.

3.8.3 Análise Estatística

A análise estatística foi por intenção de tratar, bem como a escolha dos testes de comparação entre os grupos, foi executada respeitando-se os pressupostos determinados pelos resultados, características e comportamento das variáveis de estudo.

As variáveis binomiais foram comparadas pelos testes do Qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher. As variáveis numéricas foram comparadas pelo teste T de Student ou U de Mann-Whitney. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk.

O seguimento longitudinal das áreas das úlceras, do escore PUSH, foi comparado entre os grupos por modelo linear generalizado de efeitos mistos com distribuição de probabilidade adequada a cada variável.

A magnitude do efeito nos dados nominais foi avaliada pelo Risco Relativo (RR) e seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%)⁶⁴.

Dados foram analisados no *software* SPSS 22.0⁶⁵ e considerado significativo valor de $p < 0,05$.

3.9 Procedimentos éticos

Esse estudo seguiu as recomendações da Resolução 466/12, onde foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, CAAE (53401816.2.0000.5411 – Anexo I), parecer consubstanciado número 3.055.504. O TCLE (Apêndice I) foi compreendido e assinado pelos pacientes ou responsáveis legais ao concordar em participar do estudo.

REFERÊNCIAS

1. Santos JB, Porto SG, Suzuki LM, Sostizzo LZ, Antoniazzi JL. Avaliação e tratamento de feridas: orientações aos profissionais da saúde. Porto Alegre: Hospital de Clínicas de Porto Alegre; 2011.
2. European Wound Management Association - EWMA. Documento de posicionamento: heridas de difícil cicatrización: un enfoque integral. Londres: MEP Ltd; 2008.
3. Gohel M, Poskitt K. Chronic ulceration of the leg. *St Louis*. 2013;31(5):224-8.
4. Lanau-Roig A, Fabrellas N, Sáez-Rubio G, Wilson K. Time of chronic wound healing, as part of a prevalence and incidence study. *Enfermería Glob*. 2017;16(2):454-63.
5. Martinengo L, Olsson M, Bajpai R, et al. Prevalence of chronic wounds in the general population: systematic review and meta-analysis of observational studies. *Ann Epidemiol*. 2019;29:8-15. doi: 10.1016/j.annepidem.2018.10.005.
6. Sen CK. Human Wound and Its Burden: Updated 2020 Compendium of Estimates. *Adv Wound Care*. 2021;10(5):281-292. doi:10.1089/wound.2021.0026.
7. Bowers S, Franco E. Chronic wounds: Evaluation and management. *Am Fam Physician*. 2020;101(3):159-66.
8. Souza E, Yoshida W, de Melo V, Aragão J, de Oliveira L. Ulcer due to chronic venous disease: a sociodemographic study in northeastern Brazil. *Ann Vasc Surg*. 2013;27(5):571-6.
9. Pugliese D. Infection in Venous Leg Ulcers: Considerations for Optimal Management in the Elderly. *Drugs Aging*. 2016;33(2):87-96.
10. Vivas A, Lev-Tov H, Kirsner RS. Venous Leg Ulcers. *Ann Intern Med*. 2016;165(3):ITC17-ITC32. doi: 10.7326/AITC201608020.
11. Meaume S, Couilliet D, Vin F. Prognostic factors for venous ulcer healing in a non-selected population of ambulatory patients. *J Wound Care*. 2005;14(1):31-4.
12. Borges E, Ferraz A, Carvalho D, Matos S, Lima V. Prevention of varicose ulcer relapse: a cohort study. *Acta Paul Enferm*. 2016;29(1):9-16.
13. Brown A. Implications of patient shared decision-making on wound care. *Br J Community Nurs London*. 2013;18:S26-8, S30-2.
14. Shi C, Jc D, Cullum N, et al. Compression bandages or stockings versus no compression for treating venous leg ulcers (Review). *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;7(2):1-107. doi:10.1002/14651858.CD013397.pub2.www.cochranelibrary.com

15. Partsch H, Clark M, Mosti G, et al. Classification of compression bandages: Practical aspects. *Dermatologic Surg.* 2008;34(5):600-609.
16. Percival S, Hill K, Williams D, Hooper S, Thomas D, Costerton J. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 2012;20(5):647-57.
17. Percival S, Emanuel C, Cutting K, Williams D. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J.* 2012;9(1):14-32.
18. Wong S, Manikam R, Muniandy S. Prevalence and antibiotic susceptibility of bacteria from acute and chronic wounds in Malaysian subjects. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9(9):936-44.
19. Ciofu, O., Moser, C., Jensen PØ et al. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2022:1-15.
20. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA, et al. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair Regen.* 2017;25(5):744-57.
21. Mota M, Melo S, Costa T. Estratégias de gestão de biofilmes em feridas crônicas: uma revisão de literatura. *Tissue Regen Heal.* 2012;1(1):10-8.
22. Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco O. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol.* 2017;73(3):710-21.
23. Rendueles O, Ghigo J. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol.* 2012;35(5):972-89.
24. Cutting K, McGuire J. Safe bioburden management. A clinical review of DACC technology. *J Wound Care.* 2015;24(5):S1–30.
25. Martin J, Zenilman J, Lazarus G. Molecular microbiology: new dimensions for cutaneous biology and wound healing. *J Invest Dermatol.* 2010;130:38-48.
26. Percival S, Thomas J, Williams D. Biofilms and bacterial imbalances in chronic wounds: anti-Koch. *Int Wound J.* 2010;7:169-75.
27. World Union of Wound Healing Societies (WUWHS), Florence Congress PD. Management of Biofilm. Wounds International 2016. *Wounds Int.* 2016 [citado 29 Jul 2022]. p. 1-28. Disponível em: www.wounds-uk.com/made-eas
28. James G, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen.* 2008;16(1):37-44.
29. Zhao G, Usui M, Lippman S, et al. Biofilms and inflammation in chronic wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013;2(7):389-99.
30. Percival S, McCarty S, Lipsky B. Biofilms and wounds: An overview of the

- evidence. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015;4:373–81.
31. Kim P, Steinberg J. Wound care: Biofilm and its impact on the latest treatment modalities for ulcerations of the diabetic foot. *Semin Vasc Surg*. 2012;25:70-4.
 32. Percival S, Hill K, Malic S, Thomas D, Williams D. Antimicrobial tolerance and the significance of persister cells in recalcitrant chronic wound biofilms. *Wound Repair Regen*. 2011;19(1):1-9.
 33. Souza JM, Vieira ÉC, Cortez TM, Mondelli AL, Miot HA, Abbade LPF. Clinical and microbiologic evaluation of chronic leg ulcers: A cross-sectional study. *Adv Skin Wound Care*. 2014;27(5):222-7. doi: 10.1097/01.ASW.0000445952.83084.a0
 34. Metcalf D, Parsons D, Bowler P. Clinical safety and effectiveness evaluation of a new antimicrobial wound dressing designed to manage exudate, infection and biofilm. *Int Wound J*. 2017;14(1):203-13.
 35. Abbade LPF, Andrey M, et al. Consenso sobre diagnóstico e tratamento das úlceras crônicas de perna - Sociedade Brasileira de Dermatologia. *An Bras Dermatol*. 2020;95(S1):1-18.
 36. Borges EL, Spira JAO, Amorim GL, Coelho ACSM. Biofilm formation in cutaneous wounds and its behavior in the face of interventions: an integrative review. *Rev Rene*. 2022;23:e78112.
 37. Dissemmond J, Böttrich J, Braunwarth H, Hilt J, Wilken P, Münter K. Evidence for silver in wound care - meta-analysis of clinical studies from 2000-2015. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017;15(5):524-35.
 38. Fitzgerald, D. J., Renick, P. J., Forrest, E. C., Tetens, S. P., Earnest, D. N., McMillan J. *Cadexomeriodine Provides Superior Efficacy against Bacterial Wound Biofilms in Vitro and in Vivo.*; 2016.
 39. Woo K, Dowsett C, Costa B, Ebohon S, Woodmansey EJ, Malone M. Efficacy of topical cadexomer iodine treatment in chronic wounds: Systematic review and meta-analysis of comparative clinical trials. *Int Wound J*. 2021;18(5):586-597.
 40. To E, Dyck R, Gerber S, Kadavil S, Woo K. The Effectiveness of Topical Polyhexamethylene Biguanide (PHMB) Agents for the Treatment of Chronic Wounds: A Systematic Review. *Surg Technol Int*. 2016;26(29):45-51.
 41. Ingridy L, Thorpe F. Eficácia do mel de grau médico no tratamento de úlceras de pé diabético: uma revisão sistemática. *Res Soc Dev*. 2022;2022(Ii):1-10.
 42. Yilmaz AC, Aygin D. Honey Dressing in Wound Treatment: a Systematic Review. *Complement Ther Med*. 2020;51(March):102388.
 43. Rama D, Fonseca B, Blanck M. *1ª Recomendação Brasileira Para o Gerenciamento*

- de Biofilme Em Feridas Crônicas e Complexas*. (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENFERMAGEM EM FERIDAS E ESTÉTICA, ed.); 2018.
44. Cooper R, Bjarnsholt T, Alhede M. Biofilms in wounds: A review of present knowledge. *J Wound Care*. 2014;23:570-582.
 45. Wolcott RD, Kennedy JP, Dowd SE. Regular debridement is the main tool for maintaining a healthy wound bed in most chronic wounds. *J Wound Care*. 2009;18(2):54-6.
 46. Strohhal R, Dissemond J, Jordan O'Brien J, et al. EWMA document: Debridement: An updated overview and clarification of the principle role of debridement. *J Wound Care*. 2013;22:S1-S49.
 47. Wolcott R, Rumbaugh K, James G, et al. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J Wound Care*. 2010;19(8):320-328.
 48. McCallon SK, Weir D, Lantis JC. Optimizing Wound Bed Preparation With Collagenase Enzymatic Debridement. *J Am Coll Clin Wound Spec*. 2014;6(1-2):14-23.
 49. Carter MJ, Tingley-Kelley K, Warriner RA. Silver treatments and silver-impregnated dressings for the healing of leg wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. *J Am Acad Dermatol*. 2010;63(4):668-79.
 50. Sood A, Granick MS, Tomaselli NL. Wound Dressings and Comparative Effectiveness Data. *Adv Wound Care*. 2014;3(8):511-29.
doi:10.1089/wound.2012.0401
 51. Metcalf DG, Parsons D, Bowler PG. Clinical safety and effectiveness evaluation of a new antimicrobial wound dressing designed to manage exudate, infection and biofilm. *Int Wound J*. 2017;14(1):203-13. doi:10.1111/iwj.12590
 52. Sibbald R, Woo K, Ayello E. Increased bacterial burden and infection: NERDS and STONES. *Wounds UK*. 2007;3(2):25-46.
 53. Santos V, Azevedo M, Silva T, Carvalho V, Carvalho V. Adaptação transcultural do pressure ulcer scale for healing (PUSH) para a língua portuguesa. *Rev Latino-Am Enferm*. 2005;13(3):305-13.
 54. Santos V, Sellmer D, Massulo M. Confiabilidade interobservadores do PressureUlcerScale for Healing (PUSH), em pacientes com úlceras crônicas de perna. *Rev Latino-Am Enfermagem*. *Rev Latino-Am Enferm*. 2007;15(3):391-96.
 55. Santos V, Carvalho V. Reapresentando o instrumento PressureUlcerScale for Healing (PUSH) para avaliação de úlcera por pressão e úlcera crônica de perna. *Rev*

- Estima*. 2009;7(2):19-27.
56. Borges EL, Oliveira T, Junho DC, Aparecida J, Spira O. Perfil microbiológico das infecções de úlceras de perna: estudo de revisão. *Rev Bras Enferm*. 2021;74(3):1-10.
57. Jørgensen HJ, Mørk T, Rørvik LM. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J Dairy Sci*. 2005;88(11):3810-3817.
58. Cwajda-białasik J, Mościcka P, Jawień A, Szewczyk MT. Microbiological status of venous leg ulcers and its predictors: A single-center cross-sectional study. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(24).
59. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. (ASM Press, ed.). Washington, D.C; 2007.
60. Stepanovic S, Ćirković I, Mijač V, Švabić-Vlahović M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol*. 2003;20:339–343.
61. Center for Disease Control and Prevention. Oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN): Laboratory Protocol for Molecular Typing of *S. aureus* by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE). Center for Disease Control and Prevention. https://www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar_mras_PFGE_s_aureus.pdf. Accessed September 13, 2019.
62. Namvar AE, Havaei SA, Masoumeh D. Molecular Characterization of *Staphylococcus epidermidis* Isolates Recovered from Patients Admitted to a Referral Hospital in Iran. *Arch Clin Infect Dis*. 2017;12(2):e38675.
63. Selima S, Kholyc I El, Hagagyb N, Alfayb ES, Aziz MA. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2015;29(1):152-156.
64. Patino CM, Ferreira JC. Intervalos de confiança: Uma ferramenta útil para estimar o tamanho do efeito no mundo real. *J Bras Pneumol*. 2015;41(6):565-566.
65. Margotto PR. Como fazer e interpretar no SPSS. *Esc Super Ciências da Saúde*. 2010;(Figura 1):6.

4 MANUSCRITO

Submetido ao periódico *British Journal of Dermatology*

HIDROFIBRA COM PRATA VERSUS COLAGENASE PARA TRATAMENTO DA COLONIZAÇÃO CRÍTICA EM ÚLCERAS VENOSAS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Hydrofiber with silver versus collagenase for treatment of critical colonization of venous ulcers: randomized clinical trial

Nomes dos autores:

Taís Lopes Saranholi¹, Natalie Carlos Ferreira Mello Sampaio², Hélio Amante Miot³, Stéfani Thais Alves Dantas⁴, Vera Lucia Moraes Rall⁴, Luciana Patricia Fernandes Abbade³.

Instituição:

¹Departamento de Enfermagem, Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu, São Paulo, Brasil.

² Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu, São Paulo, Brasil.

³Departamento Dermatologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁴Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu, São Paulo, Brasil.

Correspondência:

Taís Lopes Saranholi

Endereço: Professor Mário Rubens Guimarães Montenegro Avenue, Botucatu, São Paulo 18618-970, Brasil

Tel: +55 (14) 3880-1329

Email: tais_saranholi@hotmail.com

Conflito de Interesse:

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Fontes de financiamento:

Este estudo foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº: 2020/01768-3. Brasil. A agência de financiamento não teve nenhum papel no desenho do estudo; na coleta, análise e interpretação dos dados; na redação do relatório; e na decisão de submeter o artigo para publicação.

Aprovação ética:

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, atendendo às normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, e aprovado conforme Parecer nº 3.055.504.

RESUMO

Úlceras venosas são colonizadas por bactérias com capacidade de produção de biofilme, influenciando negativamente a cicatrização. O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do curativo hidrofibra com prata (HAg) comparado ao curativo com collagenase (Col) no controle da colonização crítica, da formação do biofilme por *S. aureus* e *P. aeruginosa* e da clonalidade bacteriana entre o tempo inicial e final das intervenções. Realizado um ensaio clínico randomizado, controlado, com pacientes com úlceras venosas com sinais clínicos de colonização crítica. Após desbridamento cirúrgico superficial, os participantes foram randomizados em dois grupos – intervenção (HAg) e o comparativo (Col). Os desfechos foram avaliados após 30 dias (T30) e os primários foram: taxa de úlceras sem sinais de colonização crítica, diminuição da carga bacteriana, bactérias produtoras de biofilme e clonalidade bacteriana. Foram incluídos 34 pacientes com 56 úlceras. Dezoito participantes com 28 UV no grupo HAg e 16 com 28 UV no grupo Col. No T30 o risco relativo (RR) para não colonização crítica foi de 0,81 (IC95% 0,48 – 1,37; $p=0,439$). Não houve diminuição da carga bacteriana total ao longo do tempo ($p=0,054$) e nem entre os grupos ($p=.0,0113$). Houve diminuição de úlceras com bactérias produtoras de biofilme ao longo do tempo ($p= 0,047$), mas o RR de foi de 1,0 (IC95% 0,35 – 2,86; $p > 0,999$). Apenas uma úlcera do grupo hidrofibra com prata e três do grupo Collagenase tiveram mudança de clonalidade do *S. aureus*. Não houve mudança da clonalidade da *P. aeruginosa* em nenhuma úlcera de ambos os grupos. Ambas as intervenções, melhoraram as características clínicas e microbiológicas ao longo do tempo, mas não houve diferença entre as duas intervenções após 30 dias de seguimento.

Palavras Chaves: Úlcera Venosa. Infecção das Feridas. Pacientes Ambulatoriais. Ensaio clínico.

1. INTRODUÇÃO

A úlcera venosa (UV), assim como outras úlceras crônicas são contaminadas por microrganismos que podem ser provenientes de secreções endógenas, curativos e do próprio ambiente. É muito importante entender a diferenciação entre colonização, colonização crítica (infecção superficial) e infecção profunda. A colonização irá ocorrer quando as bactérias estão se replicando no leito da úlcera, mas não causam danos ao hospedeiro. Contudo, o ambiente está suscetível às infecções bacterianas, que ocorre quando há aumento da carga microbiana na superfície da úlcera (colonização crítica ou infecção superficial/local), onde os níveis de

citocinas pró-inflamatórias dificultam a cicatrização, promovendo deterioração do tecido de granulação e exsudato em excesso. Infecção profunda ocorre quando há penetração das bactérias nos tecidos peri-úlceras, com replicação de bactérias na úlcera associada a danos ao hospedeiro, ultrapassando a capacidade de defesa imunológica, incluindo sinais de eritema, edema, aumento da temperatura, dor na região perilesional e febre^{1,2}.

Dependendo do ambiente da úlcera, pode haver a formação de diferentes tipos de biofilmes. Sua formação inicia-se quando uma bactéria na sua forma planctônica adere a uma superfície exposta, que pode ser biótica ou abiótica. Posteriormente, os micro-organismos ligam-se entre si e aderem de maneira irreversível. Começam a se proliferar, ativando o *quórum sensing*. O biofilme cresce e se diferencia, culminando em uma comunidade de biofilme maduro, apresentando características estruturais. Há formação de uma matriz composta por água e substâncias poliméricas como polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular. O biofilme maduro entra em processo de dispersão, há o destacamento de células ou de microcolônias^{3,4,5}. A dispersão pode resultar na colonização de novos nichos e consequentemente, em novos sítios de infecção com biofilme³.

A resistência de bactérias produtoras de biofilme é um problema crucial no manejo e tratamento de feridas crônicas. Em um biofilme maduro, as bactérias crescem lentamente devido à deficiência de nutrientes, resultando na resistência das bactérias aos antibióticos tópicos e sistêmicos. Também há penetração reduzida ou incompleta destes agentes nesta estrutura bacteriana⁶, além da reformulação rápida do biofilme na úlcera⁷. Desbridamento cirúrgico superficial e curativos a base de prata são linhas de tratamento descritas para combate de biofilme⁶, porém nenhum método apresenta ser completamente eficaz para os biofilmes^{8,9} e faltam evidências científicas para afirmar a melhor forma de sua remoção do leito de úlceras crônicas.

Produtos que promovem desbridamento enzimático como a collagenase não são descritos com ação anti-biofilme. A collagenase é caracterizada como uma enzima derivada da bactéria *Clostridium histolyticum* e tem ação efetiva e seletiva por agir no colágeno presente no tecido necrótico sem prejudicar o tecido de granulação. Portanto, ela é indicada como manutenção após desbridamento cirúrgico¹⁰. Devido ao uso significativo de collagenase na prática clínica, sua utilização como controle nos estudos comparativos permite a comparação da intervenção teste com um tratamento usual, que se realiza na rotina dos serviços de atenção à saúde.

O entendimento do microambiente da UV e a busca de intervenções que combatam o biofilme são relevantes para utilização das melhores estratégias terapêuticas para sua abordagem, procurando promover a cicatrização.

O objetivo deste estudo foi avaliar a ação do curativo hidrofibra com prata comparado ao curativo com colagenase, ambos após desbridamento cirúrgico superficial, no controle da colonização crítica, na interferência da formação do biofilme por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e na clonalidade das cepas isoladas nos tempos iniciais e finais, em pacientes com UV que utilizaram estas intervenções por 30 dias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio clínico randomizado-controlado, aberto, avaliador dos desfechos cego, com dois braços paralelos. Teve o registro brasileiro de ensaios clínicos (ReBEC - RBR-4kkq2h) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho (HCFMB-Unesp)”, CAAE (53401816.2.0000.5411), parecer consubstanciado número 3.055.504.

Foi realizado com os pacientes adultos atendidos no Ambulatório de Úlceras Crônicas do HCFMB-Unesp, São Paulo, Brasil, entre outubro de 2020 a novembro de 2021.

Participantes do estudo

Os indivíduos que atenderam a todos os seguintes critérios de inclusão e nenhum dos critérios de exclusão foram elegíveis para inclusão. Os critérios de inclusão foram: idade maior ou igual de 18 anos; UV crônica (úlceras ativas há mais de seis semanas) com sinais clínicos de infecção superficial (colonização crítica) segundo os critérios da regra mnemônica NERDS¹¹ se houvesse pelo menos dois dos seguintes achados: i) Úlceras que não estavam cicatrizando (N= *Nonhealing wounds*), ii) Aumento da exsudação (E= *Exudative wounds*); iii) Tecido de granulação de superfície de úlcera vermelho e sangrento (R= *Red and bleeding wound surface granulation tissue*); iv) Detritos caracterizado por tecido necrótico amarelo ou preto na superfície da ferida (D= *Debris -yellow or black necrotic tissue on the wound surface*); v) Cheiro ou odor desagradável da úlcera (S= *Smell or unpleasant odor from the wound*); Concordância com os procedimentos propostos no estudo; Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (paciente ou responsável). Critérios de exclusão: Úlceras de outras etiologias (doença arterial periférica, causas hematológicas, neoplásicas, infecciosas, etc); úlceras com infecção dos tecidos profundos, ou seja, quando associada à erisipela, celulite ou linfangite devido à necessidade de terapia antibiótica sistêmica; história de hipersensibilidade

aos tratamentos propostos; UV associada à doença arterial periférica que foi caracterizada quando o índice sistólico tornozelo-braço (ITB) era menor do que 0,8 e/ou ausência de pulsos distais, principalmente tibioso.

Randomização e intervenções

O protocolo de aleatorização foi realizado utilizando o Software Rv 3.1.2 e foi por participante e não por úlcera. A lista de randomização permaneceu sob os cuidados de um indivíduo alheio a seleção clínica dos participantes para garantir a ocultação da alocação. A Randomização foi realizada no T0 e o participante poderia ser alocado para o grupo Col ou grupo HAg.

Após a inclusão no estudo, foi realizada a medida da área de todas as úlceras dos participantes incluídos no estudo no tempo basal (T0). Posteriormente foi realizada a limpeza da úlcera com soro fisiológico (SF) 0,9%. Logo após houve a coleta de material por meio de swab para análises microbiológicas. Na sequência, era realizado o desbridamento cirúrgico superficial do leito da(s) úlcera(s). Este procedimento foi realizado com anestesia tópica local (creme contendo lidocaína 4%) mantido sob oclusão por 30 min. Após esse tempo foi o desbridamento era feito com cureta em todo o leito ulcerado.

Após desbridamento superficial, os participantes foram randomizados em 2 grupos. O grupo 1 ou grupo Hidrofibra com prata (HAg) foi composto por participantes tratados com o curativo de hidrofibra com prata (AQUACEL® Ag+ Extra™), na forma de placa com troca quando atingisse a sua saturação (aproximadamente quatro dias). No grupo 2, os participantes foram tratados com curativo de Colagenase (Col) não associada a antibióticos (Kollagenase®). A apresentação da colagenase foi em pomada e a quantidade de aplicação dependia do tamanho da úlcera, mas devia ser em quantidade suficiente para cobrir todo leito ulcerado com uma camada mínima de 2mm e após cobertura secundária com gaze, com troca uma vez ao dia.

Em ambos os grupos foi associada a terapia com faixa elástica compressiva (Surepress®), com aplicação uma vez ao dia (pela manhã e retirada ao final do dia). Este é um sistema de compressão composto por única camada, com compressão em torno de 25 a 35 mmHg no tornozelo. Todos os participantes ou cuidadores receberam as orientações para cuidados com as úlceras em domicílio durante o período do estudo.

Desfechos

Foram avaliados os seguintes desfechos no T30

- Primários: (i) taxa de úlceras sem sinais de infecção superficial (ou colonização crítica) segundo os critérios clínicos da regra mnemônica NERDS¹¹; (ii) Análises microbiológicas -

taxa de úlceras com diminuição da carga bacteriana; taxa de úlceras com bactérias produtoras de biofilme; taxa de úlceras com mudança da identidade bacteriana (clonalidade).

- Secundários: (i) melhora clínica das UV avaliado pela escala de PUSH¹²; (ii) diminuição da área da úlcera pelo método planimétrico; (iii) taxa de cicatrização avaliado clinicamente pela observação da epitelização total sem presença de crostas no local da UV; (iv) Eventos adversos locais relacionados às intervenções.

Todos os desfechos foram avaliados por examinador cego, ou seja, sem conhecimento do grupo que o participante foi randomizado.

Procedimentos do estudo

As áreas das UV foram analisadas antes do início do tratamento (T0) e no 30º dia (T30) por meio do método planimétrico. As úlceras foram fotografadas com uma réqua adjacente à borda da úlcera para criar um referencial externo. Por meio do software *Image J 1.37v* foi estabelecido a relação do comprimento (pixels/mm) individualizada para cada foto e realizado o traçado manual do perímetro das úlceras calculando a área em pixel e transformada em cm². Para cada úlcera este procedimento foi realizado três vezes, considerando como resultado a média das áreas.

A avaliação das características dos leitos das UV foi realizada por meio das imagens fotográficas no início do tratamento (T0) e no 30º dia (T30) das intervenções. A presença de sinais clínicos de infecção superficial (ou colonização crítica) foi avaliada, no início do tratamento (T0) e no final (T30), segundo os critérios baseados na regra mnemônica NERDS¹¹.

Para a avaliação da evolução do processo cicatricial da úlcera, foi empregada a escala de PUSH (*Pressure Ulcer Scale for Healing*)^{12,13} no início (T0) e no 30º dia (T30) das intervenções. Esta escala considera três parâmetros para avaliação do processo de cicatrização da ferida. O primeiro parâmetro caracteriza a área da úlcera em cm² (escores variam de 0 a 10). No segundo parâmetro avalia-se a quantidade de exsudato, classificada como ausente, pequena, moderada e grande (escores de 0 a 3). Por fim, no terceiro parâmetro é avaliado a aparência do leito da úlcera, classificada como tecido necrótico, esfacelo, tecido de granulação, tecido epitelial e ferida fechada ou recoberta (escores 0 a 4). Portanto o escore total pode variar 0 a 17, escores maiores indicam piores condições da úlcera.

Análises Microbiológicas

Todas as análises microbiológicas foram realizadas no laboratório de microbiologia do Instituto de Biociências da Unesp – campus Botucatu. Neste estudo foram escolhidas para serem analisadas as bactérias mais prevalentes e produtoras de biofilme em UV citadas na

literatura, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O *S. epidermidis* também foi avaliado por ser uma bactéria com capacidade de produzir biofilme¹⁴. As outras bactérias que apareceram nas culturas foram apenas descritas se presentes e sua carga, mas não foram avaliadas quanto a produção de biofilmes e identidade bacteriana entre T0 e T30. Para coleta das amostras, as úlceras foram irrigadas com solução salina a 0,9% sob pressão mecânica. Um molde de gaze estéril com uma abertura central predeterminada de 1 cm² foi colocado no leito ulcerado que havia aparência de mais tecidos inviáveis. O swab foi umedecido em solução salina estéril (0,9%), sendo friccionado por todo o campo exposto. Após, o swab foi acondicionado em tubo com 3 mL de solução salina estéril (0,9%), que foi colocado sob refrigeração e imediatamente encaminhado para as análises microbiológicas.

- Identificação de *S. aureus* e *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*

Cada swab foi submetido a 3 minutos de vórtex, para a liberação das bactérias nos 3 ml de salina e um volume de 100 µl foi semeado na superfície de uma placa de ágar sangue (5% sangue desfibrinado de carneiro) e ágar manitol (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e ágar Cetrimide (*P. aeruginosa*) espalhados com o auxílio de uma alça em L (técnica de spread). As placas foram incubadas a 35°C, por até 48 horas e após esse período, colônias características de cada espécie foram contadas, estocadas em ágar tripticase soja (TSA) e submetidas a testes de triagem como coloração de Gram, catalase e coagulase em tubo¹⁵ (*S. aureus* e *S. epidermidis*) e oxidase e crescimento à 42°C (*P. aeruginosa*). A seguir, a identificação definitiva foi realizada com o auxílio do kit API Staph e o kit API 20 NE (BioMérieux) para *Staphylococcus* e *Pseudomonas* respectivamente. Para o cálculo do número de UFC/cm², o número de colônias confirmadas foi multiplicado por 10 (inóculo de 100 µl) e depois por 3 (total de 3 ml no tubo do swab)¹⁶.

Também foi realizado a identificação do *S. aureus* por amplificação por PCR para confirmar a presença do estafilococo espécie-específico gene nuclease (nuc; CRL-AR, 2009)¹⁷ e para a identificação de *P. aeruginosa* a confirmação foi realizada pela presença do gene oprI¹⁵.

- Produção de biofilme em microplaca de poliestireno

Cada cultura de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*, crescida em BHI a 35°C/24h, foi diluída a, aproximadamente, 1,5x10⁸ UFC (0,5 escala de MacFarland), com o auxílio do Denscheck (Biomeriëux), utilizando-se BHI suplementando com 0,5% de glicose. Uma alíquota de 200 µL foi semeada em quadruplicata, em microplaca de 96 poços. Após incubação de 48 horas, a placa foi lavada três vezes, com PBS (pH 7,4), seca à temperatura ambiente e corada com violeta cristal 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, para a remoção do corante, o biofilme foi ressuspendido em 200 µL de ácido acético glacial 33% (v/v)

por 10 minutos e a densidade óptica (DO) foi mensurada em leitor de ELISA, (Babsystems, MultiSkan EX), em 570 nm. BHI não inoculado foi utilizado como controle negativo das reações. O controle positivo de *P.aeruginosa* foi a ATCC 9027 e dos estafilococos foi *S. epidermidis* ATCC 35983. A partir da média das quatro repetições (D.O.) e de acordo com a relação entre a D.O. (amostra em teste) e D.O.c (controle negativo), as amostras foram classificadas em não produtoras, fracas, moderadas ou fortes produtoras de biofilme, segundo Stepanovic *et al*¹⁸.

- Identificação da tipagem bacteriana por Eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel de Eletroforese* – PFGE)

A tipagem molecular pela técnica PFGE foi realizada para as bactérias *S. aureus*, e *P. aeruginosa* que foram da mesma espécie em uma determinada úlcera no T0 e T30. Para as cepas de *S. aureus*, foi usada a metodologia utilizada do Pulsenet¹⁹, usando a enzima de restrição SmaI Fast (Thermo Scientific) (2 µL/6 min/ 37°C) .. O DNA digerido foi separado por eletroforese usando o Chef Mapper (Biorad, Hercules, Califórnia) com os parâmetros de: pulso inicial de 5 segundos, pulso final de 40 segundos, voltagem de 6V/cm e ângulo de 120°, no total de 21 horas. Ao término da corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo e analisado e fotografado em analisador de imagens (AlphaImager – Alpha Esasy FC Software – AlphaInotech Corporation). Como marcador de pares de base, foram utilizados fragmentos de DNA da *S. aureus* NTCT 8.325²⁰.

Para as cepas de *P.aeruginosa*, foi usada a metodologia para Gram negativos de Selima *et al*²¹. Cada isolado de foi semeado em placa de ágar tripticase de soja (TSA, Oxoid), incubada a 35 °C/24 h. Em seguida, foram preparadas as suspensões bacterianas em tampão de suspensão celular (Tris 100 mM, EDTA 100 mM, pH 8,0) de modo a obter densidade óptica de 0,8 a 1,0 em espectrofotômetro a 610 nm. Após esse procedimento, 200 µL da suspensão celular foram transferidos para um tubo de microcentrífuga, adicionado de 10 µL de proteinase K (20 mg/mL), 5 µL de lisozima (40 mg/mL) e 200 µL de agarose ultrapura a 1,2 % (Bio-Rad) em solução de Tris-EDTA (TE, Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0). A mistura foi colocada em moldes para confecção dos plugs. Após solidificação, os plugs foram transferidos em solução de lise (Tris 50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0 + 1 % de sarcosil + 0,1 mg/mL Proteinase K) onde foram mantidos nessa solução a 54 °C/2 h em agitação constante a 120 rpm. Após esse período, os plugs de agarose foram lavados duas vezes com água ultrapura a 50 °C/15 min e mais quatro vezes com tampão TE a 50 °C/15 min, sendo estocados em tampão TE a 4 °C.

Para a digestão do DNA, uma fatia de aproximadamente 2 mm de largura foi incubada a 37 °C/overnight com 30 U de SpeI juntamente com o tampão apropriado. Em seguida, os fragmentos dos plugs foram colocados em gel de agarose ultrapura a 1 % em tampão TBE (0,5x) e inseridos na cuba do equipamento Chef Mapper (Bio-Rad) nas condições: pulso inicial: 2 s, pulso final: 40 s, voltagem: 6 V/cm, ângulo: 120°, tempo: 20 h. Ao término da corrida, os géis foram corados em 300 mL de água destilada com 30 µL de brometo de etídio 1 % (Sigma) por 30 min, seguido por uma lavagem de 30 min com água destilada, e fotografado em analisador de imagens Alphamager 2200. Os padrões de bandas de DNA em gel foram analisados utilizando o software Bionumerics (versão 7.6), para determinar o parentesco dos isolados e o agrupamento foi realizado pelo método de clusterização UPGMA usando o coeficiente de Dice. Como marcador de pares de base, foram utilizados fragmentos de DNA da *Salmonella enterica* serovar Braenderup H9812 (ATCC® BAA664™).

Tamanho Amostral e Análises estatísticas

Para o tamanho amostral assumimos a hipótese de que 20% das UV permaneceriam com infecção superficial no grupo HAg e 60% no grupo Col e considerando 80% de poder estatística e nível de significância bicaudal de 95%, foram necessárias 27 UV por grupo de intervenção.

A análise estatística foi por intenção de tratar, foi executada respeitando-se os pressupostos determinados pelos resultados, características e comportamento das variáveis. As variáveis binomiais foram comparadas pelos testes do Qui-quadrado (χ^2) e exato de Fisher. As variáveis numéricas foram comparadas pelo teste T de Student ou U de Mann-Whitney. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. O seguimento longitudinal das áreas das úlceras, do escore PUSH, foi comparado entre os grupos por modelo linear generalizado de efeitos mistos com distribuição de probabilidade adequada a cada variável. A magnitude do efeito nos dados nominais foi avaliada pelo Risco Relativo (RR) e seu intervalo de confiança de 95% (IC 95%)²². Dados foram analisados no *software* SPSS 22.0²³ e considerado significativo valor de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

Durante o período de estudo, foram avaliados 74 participantes para analisar se atendiam aos critérios de elegibilidade (Figura 1). Destes, foram excluídos 40 devido aos seguintes motivos: 12 úlceras mistas (UV e arterial), cinco por estarem com UV não colonizadas; três por UV em uso de antibióticos, três por UV cicatrizadas, dois por UV circunferencial e 15 por úlceras não venosas de diferentes etiologias (vasculites, necrobiose lipoídica, microoclusão

vascular, traumática, doença falciforme, artrite reumatoide, pioderma gangrenoso e úlcera arterial). Portanto, 34 participantes com 56 UV foram elegíveis e randomizados para o estudo. Dezoito participantes com 28 UV foram randomizados para o grupo HAg e 16 participantes com 28 UV para o grupo Col. Após 30 dias de seguimento, um participante do grupo HAg com uma úlcera e um participante do grupo Col, descontinuaram as intervenções.

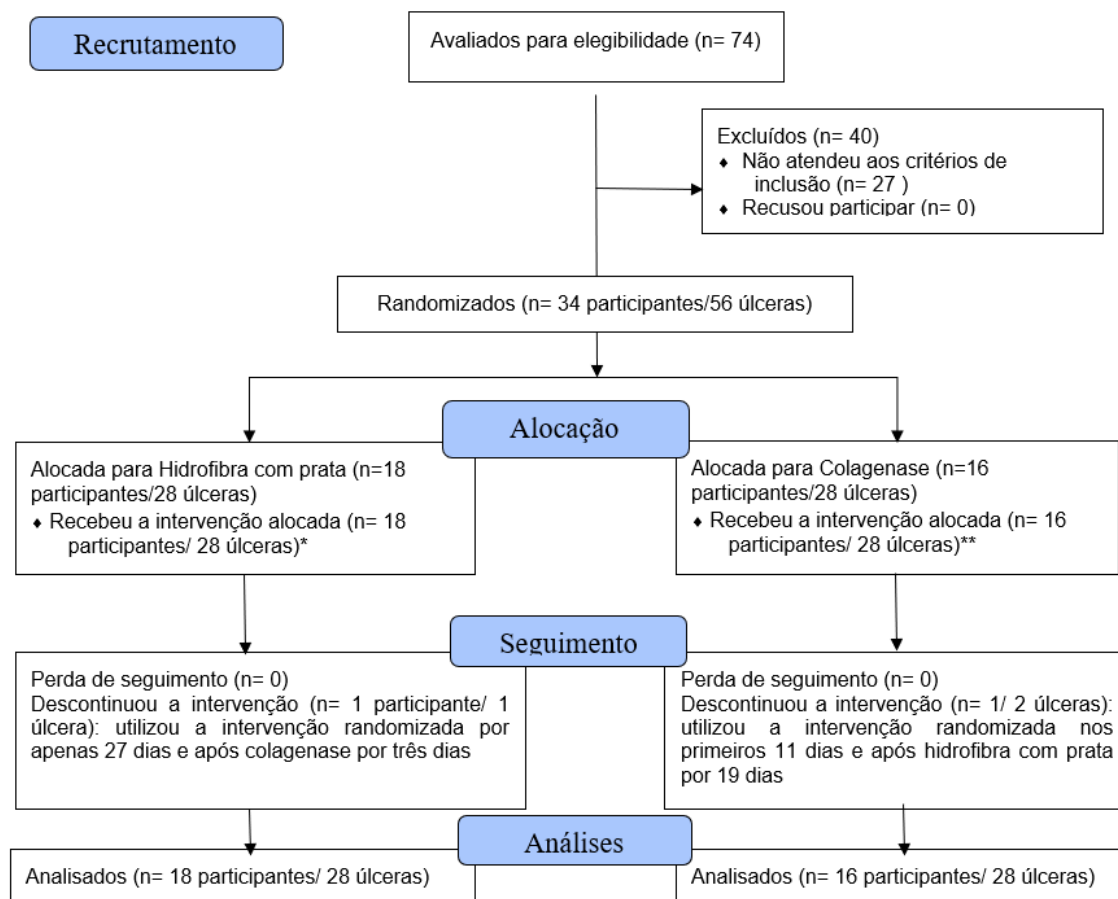


Figura 1: Fluxograma do estudo segundo CONSORT. Realizada análise por intenção de tratar (ITT).

Na tabela 1 são apresentados os dados demográficos e clínicos dos participantes no tempo basal (T0), distribuídos por grupo de estudo. Observa-se que os grupos de estudo são homogêneos, não havendo diferença estatística entre as variáveis.

Tabela 1: Distribuição dos 34 participantes (56 úlceras) por grupo de estudo de acordo com dados demográficos e clínicos no tempo basal (T0).

Variáveis relacionadas aos pacientes	Grupo		Total n=34 (%)	Valor <i>p</i>
	Col n=16 (%)	HAg n=18 (%)		
Idade média (em anos) média (±DP)	70,7 (± 9,2)	68,6 (± 8,9)	69,6 (± 9,0)	0,94
Sexo Feminino	11 (68,8)	13 (72,2)	24 (70,6)	0,83
Sexo Masculino	5 (31,3)	5 (27,8)	10 (29,4)	0,83
HAS	11 (68,8)	14 (77,8)	25 (73,5)	0,58
DM	5 (31,3)	6 (33,3)	11 (32,3)	0,90
Histórico procedimento cirúrgico vascular	6 (37,5)	4 (22,2)	10 (24,4)	0,36
Mobilidade Reduzida do tornozelo	9 (56,2)	10 (55,5)	19 (55,8)	0,97
História de TVP	5 (31,3)	3 (16,7)	8 (23,5)	0,35
ITB- Mediana (max - min)	1,07 (0,80 – 1,50)	1,05 (0,93 – 1,21)	1,06 (0,80 – 1,50)	0,25
Variáveis relacionadas às úlceras - Mediana (min – max)	n= 28 úlceras	n=28 úlceras	Total n=56 úlceras	Valor <i>p</i>
Tempo de úlcera (meses)	24,0 (1,0 – 168,0)	42,0 (2,0 – 600,0)	30 (1,0 – 600,0)	0,25
Área das úlcera (cm²)	10,3 (1,0 – 96,9)	14,3 (1,0 – 123,3)	11,2 (1,0 – 123,3)	0,74

Desfechos Primários

Taxa de úlceras sem sinais clínicos de colonização crítica no T30

Houve diminuição de úlceras com critérios de colonização crítica nos dois grupos ao longo do tempo. Em 29/56 úlceras (51,8%; IC95% 39,0% - 64,3%) chegaram ao T30 desse

estudo sem sinais de colonização crítica, segundo critérios NERDS, 13/28 do grupo HAg (46,4%; IC95% 28,6% – 65,4%) e 16/28 do grupo Col (67,1%; IC95% 40,0% – 73,4%), não havendo diferença estatística entre os grupos ($p=0,422$). O RR para não colonização crítica ao final de 30 dias no grupo HAg em relação ao grupo Col foi de 0,81 (IC95% 0,39 – 1,68). (Material suplementar – Figura 1).

Taxa de úlceras com diminuição da carga bacteriana

Um exemplo do PCR para identificação do *S. aureus* e *P. aeruginosa* podem ser vistos nas figuras 6 e 7 do material suplementar.

Foi possível identificar que não houve diminuição da carga bacteriana total ao longo do tempo ($p=0,054$) e nem entre os grupos ($p=0,113$) (Material suplementar – Figura 2).

No T0 37/56 úlceras tiveram crescimento de *S. aureus* (66,1%, IC95% 53% - 77,1%); no grupo HAg ocorreu em 16/28 (57,1%; IC95% 39,1% – 73,5%) e no grupo Col em 21/28 úlceras (75%; IC95% 56,6% - 87,3%). No T30, 46/56 (82,1%; IC95% 70,1% - 90%) tiveram crescimento de *S. aureus*, no grupo HAg ocorreu em 20/28 úlceras (71,4%; IC95% 52,4% - 84,75%) e no grupo Col em 26/28 úlceras (92,8%, IC95% 77,5% - 98,0%). Não houve diferença com significância estatística ao longo do tempo ($p=0,345$) e de acordo com os grupos de intervenção ($p=0,336$) (Material suplementar - Figura 3).

Quanto a *P. aeruginosa*, no T0 houve crescimento em 16/56 úlceras (28,5%; IC95% 18,4% - 41,5%), no grupo HAg ocorreu em 11/28 (39,3%; IC95% 23,6% - 57,6%) e no grupo Col ocorreu em 5/28 (17,8%; IC95% 7,9% - 35,6%). No T30, 13/56 úlceras tiveram crescimento de *P. aeruginosa* (23,2%; IC95% 14,1% - 35,8%), no grupo HAg ocorreu em 7/28 úlceras (25%; IC95% 12,7% - 43,3%) e no grupo Col em 6/28 úlceras (21,4%, IC95% 10,2% - 39,5%). (Material Suplementar – Figura 3). O *S. epidermidis* ocorreu em apenas três úlceras no T0 (Material suplementar – Figura 4).

Para as outras espécies de bactérias não foi possível realizar avaliação estatística por não convergência do modelo estatístico (Material Suplementar – Figura 4 e 5).

Taxa de úlceras com bactérias produtoras de biofilme

Houve diminuição de úlceras com bactérias produtoras de biofilme em relação T0 ao T30 ($p=0,047$), mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos no T30 ($p=0,558$).

No T30, no grupo HAg 13/28 (46,4%; IC95% 28% – 63%) não apresentaram bactérias produtoras de biofilme e no grupo Col também foram 13/28 (46,4%; IC95% 28% – 63%).

Portanto o RR de úlceras com bactérias não produtoras de biofilme foi de 1,0 (IC95% 0,46 – 2,16; $p = 1,000$). Os resultados de produção de biofilme por cepas de bactérias estão apresentados na figura 2.

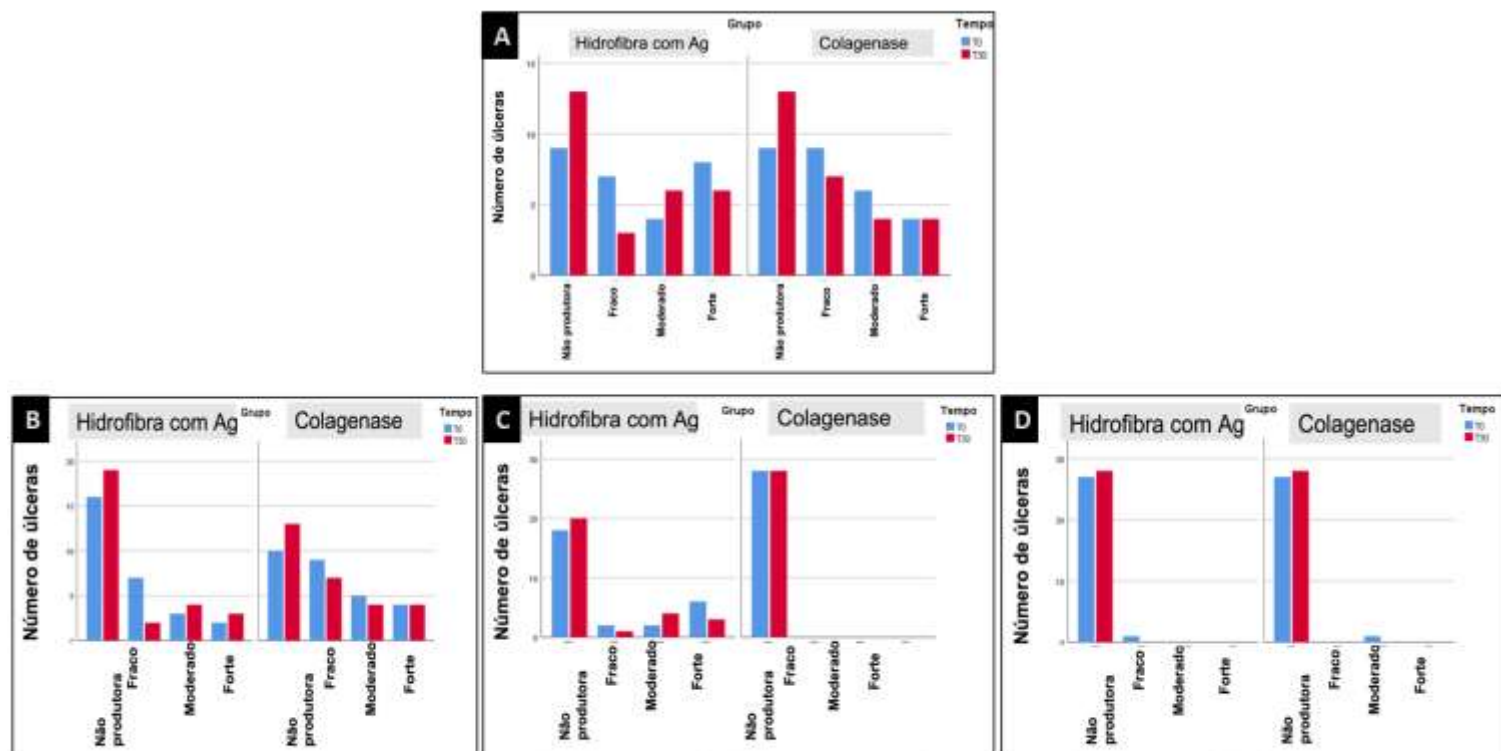


Figura 2: Classificação das cepas bacterianas produtoras de biofilme. (A) Classificação de todas as cepas bacterianas avaliadas de forma conjunta (*S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. epidermidis*). (B) Capacidade da bactéria *S. aureus* produzir biofilme. (C) Capacidade da bactéria *P. aeruginosa* produzir biofilme. (D) Capacidade da bactéria *S. epidermidis* produzir biofilme.

Taxa de úlceras com mudança da identidade bacteriana

A tipagem molecular pela técnica PFGE foi realizada para as bactérias (*S. aureus* e *P. aeruginosa*) que foram da mesma espécie em uma determinada úlcera no T0 e T30. Não foi realizada a tipagem para *S. epidermidis*, uma vez que não houve crescimento desta bactéria no T0 e T30 de uma mesma úlcera.

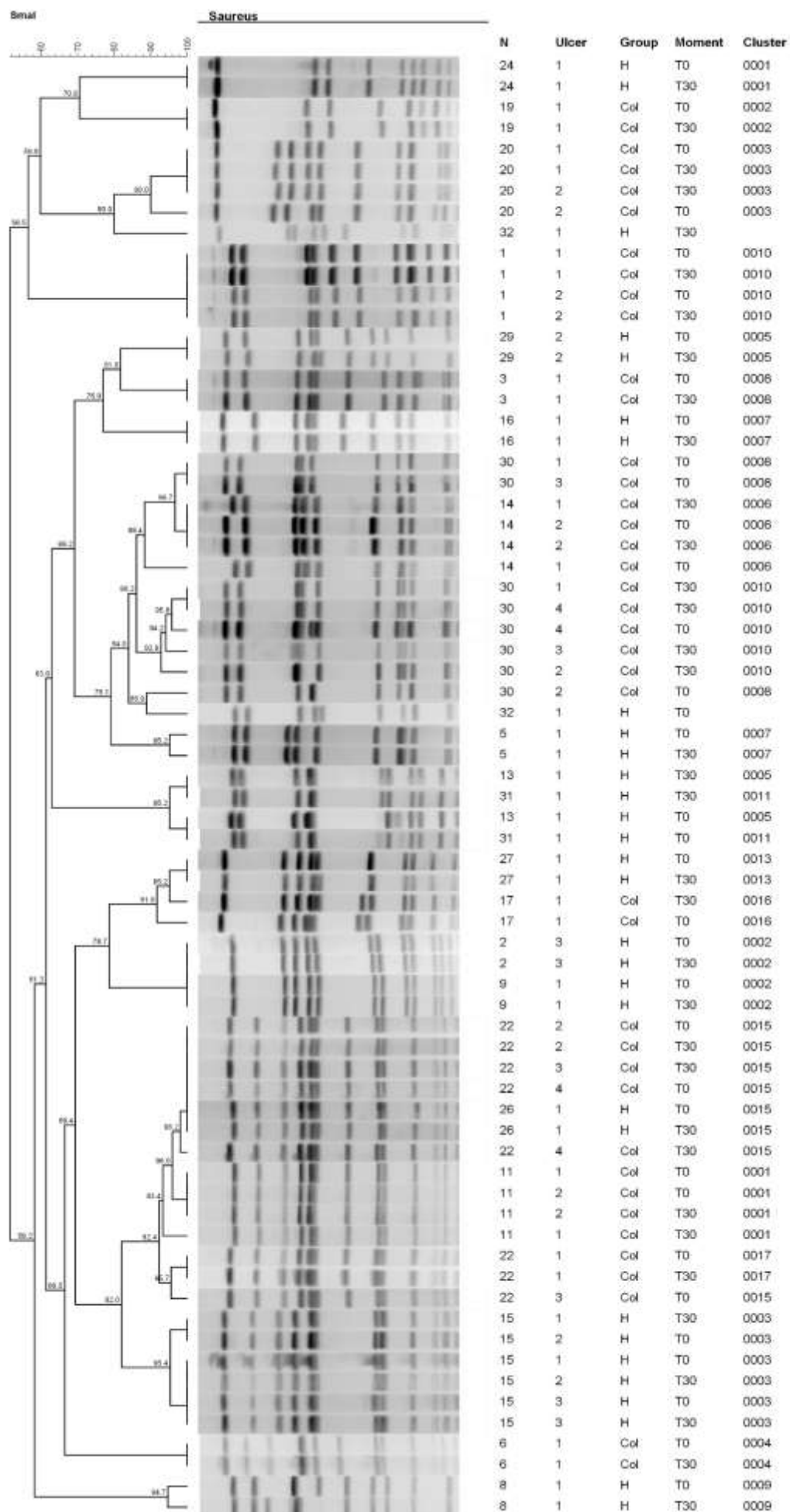


Figura 3: Dendrograma de similaridade genética das úlceras com *S. aureus*.

Na figura 3 estão demonstrados os resultados do dendrograma de similaridade genética de *S. aureus* das úlceras que houve crescimento desta bactéria no T0 e T30. Foi possível identificar a existência de 17 clones totais de bactérias, em 22 participantes em diferentes momentos e grupos deste estudo. Nesse sentido, foi destacado que há grande similaridade, acima de 80%, na maioria das lesões, onde apresentaram o mesmo clone no T0 e no T30.

No grupo HAg, 16 de 28 úlceras (57,1%; IC 39,7% - 73,5%) tiveram cultura positiva para *S. aureus* no T0 e 14/16 (87,5%; IC95% 64,0% - 96,5%) mantiveram cultura positiva para esta bactéria T30, sendo que em 13/14 úlceras (92,8%; IC95% 68,5% - 98,7%) os clones identificados no T0 foram os mesmos identificados no T30, portanto houve mudança da identidade bacteriana apenas em uma úlcera. Já no grupo Col, 21 de 28 úlceras (75,0%, IC95% 56,6% - 87,3%) tiveram cultura positiva para *S. aureus* no T0 e 20/21 úlceras (95,2%; IC 95% 77,3% - 99,1%) mantiveram cultura positiva para esta bactéria no T30 e a identidade bacteriana foi a mesma no T0 e T30 em 17/20 (85%, IC95% 64,0% - 94,8%), portanto mudança da identidade bacteriana em três úlceras. O RR para ter *S. aureus* com mudança de identidade é de 0,58 (IC95% 0,10 – 3,31; $p=0,553$), portanto sem diferença com significância estatística entre os grupos.

Pode-se observar na figura 3 que o participante 30 (lesão 1, 2 e 3) do grupo Col no T0 foi detectado a presença do clone 8, entretanto, na lesão 4 do mesmo participante foi detectado o clone 10. Vale ressaltar que no T30 houve a presença do clone 10 em todas as lesões. O clone 2 foi encontrado em úlceras de diferentes participantes deste estudo tanto no T0 quanto do T30 (participantes 2, 9 e 19). O mesmo ocorreu com o clone 8, onde foi detectado no participante 3 do grupo Col (T0 e T30) e no participante 30 do grupo Col no T0. Na lesão do participante 32 não houve a identificação de nenhum clone, tanto no T0, quanto no T30. (Material suplementar – Tabela 1).

A análise do PFGE nas cepas de *P. aeruginosa* são observados no dendrograma da figura 4. Este dendrograma foi criado usando-se uma partição final de 8 agrupamentos, que ocorre em um nível de similaridade de acima de 80%. Em todas as lesões do dendrograma foi identificado elevada similaridade dos clones no T0 e no T30. Foi possível identificar 8 clones presentes em 7 participantes com 11 úlceras no total, sendo 9/28 úlceras do grupo HAg (32,1%) e 2/28 (7,14%) úlceras do grupo Col. Não houve mudança da identidade da *P. aeruginosa* em

nenhuma úlcera de ambos os grupos. No participante 29 foi detectado que a lesão 1 apresentou diferente clone no T0, comparado as lesões 3 e 4. (Material suplementar – Tabela 2).

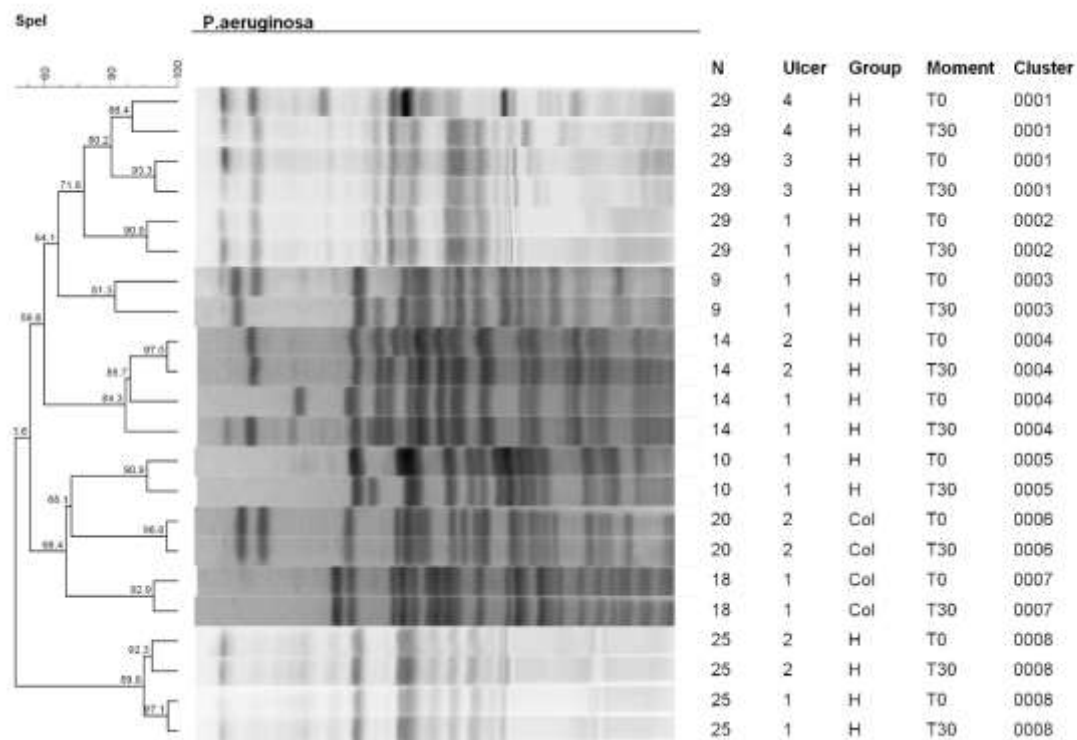


Figura 4: Dendrograma de similaridade genética das úlceras com *P. aeruginosa*.

Desfechos Secundários

Melhora clínica das UV

Houve a aplicação da escala PUSH nos dois grupos. Este escore possui uma variação de 0 a 17, dessa forma quanto maior o escore, piores são as condições cicatriciais das úlceras. No grupo HAg, o valor médio no T0 foi de 13,5 ($\pm 2,5$) e no T30 de 12,7 ($\pm 3,3$). No grupo Col, o valor médio no T0 foi de 13,5 ($\pm 2,5$) e no T30 de 12,4 ($\pm 2,9$). Houve melhora no escore de acordo com o tempo para os dois grupos ($p= 0,001$), mas sem diferença com significância estatística entre os grupos ($p= 0.0668$). A média de redução do escore do *PUSH* no grupo HAg foi de - 6,8 (IC 95% -1,3 a -13,0) e no grupo Col foi de -7,6 (IC95% -1,10 a -14,1), apresentado na figura 5, confirmando que não houve diferença entre os grupos.

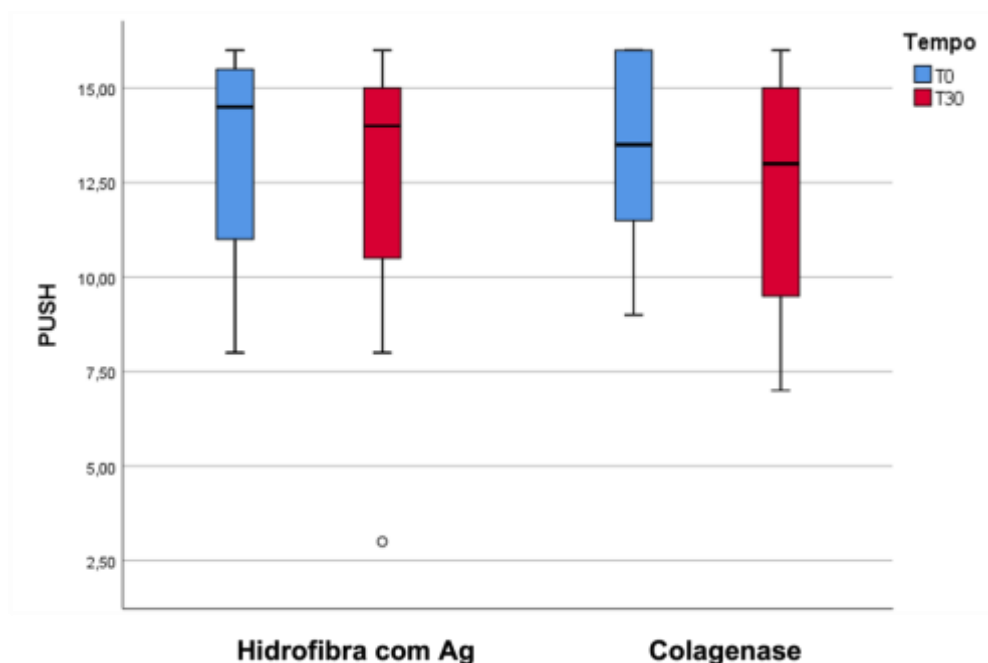


Figura 5: Escore pela escala de PUSH das úlceras no T0 e T30 de acordo com os grupos de intervenção.

Diminuição da área da úlcera e cicatrização total

A figura 6 demonstra a média de redução das áreas no grupo HAg foi de - 0,78 (IC 95% --0,20 a -1,36) e no grupo Col foi de 1,1 (IC 95% -0,20 a -2,00). Houve diminuição das áreas nos dois grupos em função do tempo ($p=0,001$), mas sem diferença com significância estatística entre os grupos ($p=0,786$). Não houve úlceras com completa cicatrização nos dois grupos analisados.

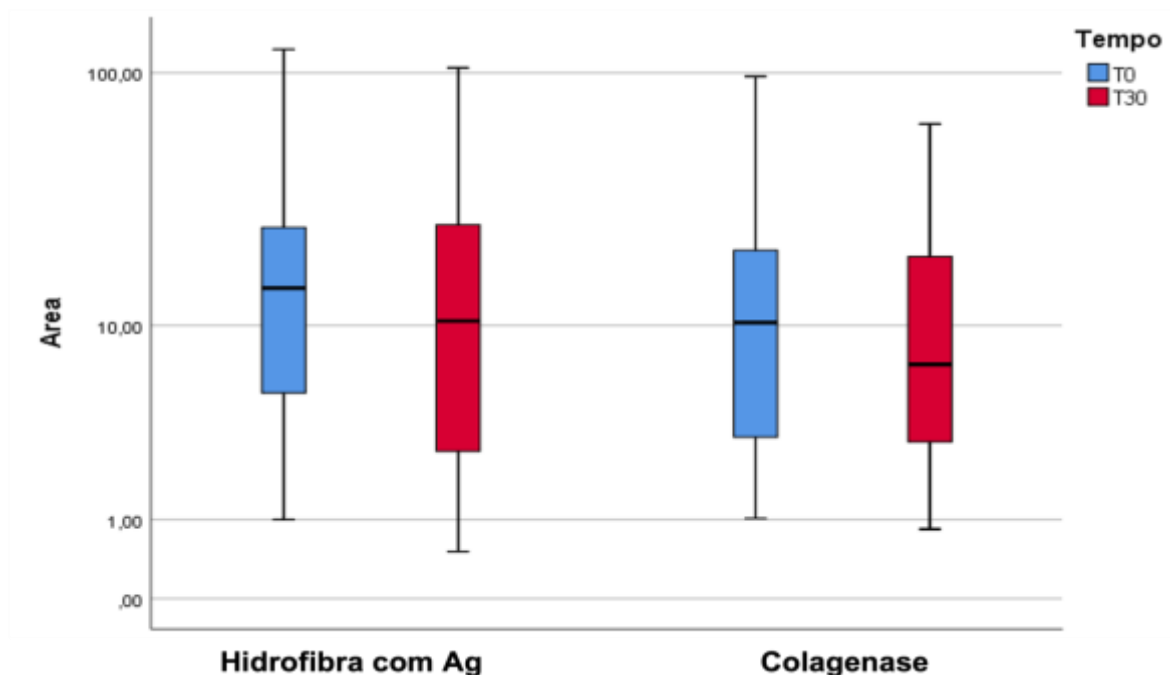


Figura 6: Áreas das úlceras no T0 e T30 de acordo com os grupos de intervenção.

Eventos adversos

Não houve eventos adversos considerados relacionados às duas intervenções. Um paciente com 4 lesões do grupo Col apresentou miíase secundária, mas este evento não foi relacionado à intervenção.

4. DISCUSSÃO

Avaliar intervenções que atuem na carga bacteriana e biofilmes das UV é de fundamental importância, considerando a alta prevalência de 60% a 78% de biofilmes nas feridas crônicas^{3,24,25}. Nosso estudo foi delineado especificamente para avaliar, em curto período de tempo, a capacidade da hidrofibra com prata em atuar em desfechos clínicos como infecção local e microbiológicos como diminuição da carga bacteriana e inibição de bactérias produtoras de biofilme. Além disto, avaliamos se o curativo seria capaz de eliminar as bactérias que estavam inicialmente colonizando as feridas, por meio de avaliação da clonalidade bacteriana, comparando o tempo basal com o tempo final de seguimento. Ambas as intervenções, promoveram diminuição de úlceras com critérios de colonização crítica ao longo do tempo, mas sem diferença com significância estatística entre os grupos. Outro resultado importante é que não houve diminuição da carga bacteriana total ao longo do tempo, sem diferença entre os grupos. Também houve diminuição de úlceras com bactérias produtoras de biofilme em relação T0 ao T30, entretanto sem diferença estatisticamente significante entre os

grupos. Outro resultado que vale ressaltar é que a maioria das úlceras não tiveram mudança da identidade bacteriana entre T0 e 30, sem diferença entre os grupos.

A hipótese inicial era que o curativo hidrofibra com prata seria superior ao curativo com collagenase, uma vez que há várias evidências da sua ação no combate à colonização crítica e biofilmes devido suas propriedades antimicrobianas^{26,27,28}. Curativos contendo prata são reconhecidos por reduzir a carga bacteriana e atuar como uma barreira antimicrobiana para evitar maior contaminação da ferida por micro-organismos externos. Esses curativos têm um baixo risco de resistência bacteriana quando contém a dose adequada de prata²⁶. A prata tem atividade descrita contra bactérias gram-negativas, gram-positivas, fungos e vírus²⁹. Contudo, recentemente há também relatos de resistência bacteriana à prata³⁰.

Os ensaios clínicos com os curativos impregnados com prata em geral avaliam desfechos de cicatrização. Os desfechos relacionados ao controle local da infecção e desfechos microbiológicos não são avaliados, dificultado a comparação com nossos achados.

Uma revisão sistemática com metanálise da Cochrane de 2010 concluiu que não havia evidência para confirmar se os produtos contendo prata podem promover a cicatrização de feridas³¹. Entretanto outras revisões sistemáticas mais recentes encontraram resultados diferentes. A revisão sistemática da Cochrane de 2018 sobre curativos e agentes tópicos para tratamento de úlceras venosas, encontrou evidência de que os curativos com prata podem aumentar a probabilidade de cicatrização de UV, em comparação com curativos não aderentes (RR 2,43, IC 95% 1,58 a 3,74) com evidência de certeza moderada³². A revisão sistemática realizada em 2020 com curativos a base de prata especificamente para UV incluiu oito ensaios clínicos randomizados, totalizando 1.057 pacientes, 526 participantes com curativos com prata e 531 controles. Os desfechos avaliados foram os clínicos tais como diminuição da área da ferida e cicatrização. Houve evidências de que curativos contendo prata podem acelerar a taxa de cicatrização de UV e melhorar sua cicatrização em um curto período de tempo. No entanto, em comparação com outros curativos, são necessários ensaios clínicos com dados de acompanhamento de longo prazo para confirmar se os curativos de prata têm vantagens em relação à cicatrização completa da ferida³³.

Vale ressaltar que no nosso estudo, ambos os grupos foram submetidos a desbridamento por meio de curetagem cirúrgica superficial antes da randomização, o que pode explicar os resultados semelhantes entre os dois grupos. O desbridamento representa uma estratégia de tratamento contra biofilmes, mas é incapaz de removê-lo completamente, além do que ocorre sua reformação algumas horas após o procedimento. Portanto, não é recomendado para uso

isolado, mas é uma estratégia que favorece a maior eficácia das terapias tópicas antibiofilme que são realizadas pós desbridamento por abrir uma janela de oportunidades³⁴.

O biofilme e a carga bacteriana das úlceras promovem atraso na cicatrização e podem ocasionar desenvolvimento de infecções^{35,36}. Portanto, o conhecimento dos microrganismos mais frequentes em úlceras crônicas fornecem um caminho para criar estratégias de tratamento de feridas. A correlação clínico-laboratorial em relação à flora bacteriana de úlceras crônicas é um desafio. A amostra microbiológica pode ser analisada de forma qualitativa ou quantitativa. Nesse estudo foi realizado o swab em uma área pré-determinada que possibilitou a análise quantitativa e das espécies bacterianas. A técnica com swab é menos invasiva e pode ser realizada para uma análise qualitativa, semiquantitativa ou quantitativa. Muito utilizada em pacientes ambulatoriais, estudos mencionam a execução da técnica de swab de Levine, a qual consiste em uma técnica de maior recuperação quantitativa de microrganismos³⁷.

As bactérias mais frequentemente encontradas em úlceras crônicas são *S. aureus* seguido por *P. aeruginosa*, enquanto a prevalência dos outros tipos varia nos diferentes estudos³⁷. A úlcera tem o potencial de evoluir para infecção de partes moles mais profundas quando as bactérias atingem um nível crítico de 10^5 unidades formadoras de colônias por grama de tecido. Quando o número de bactérias aumentam acima desse nível, a probabilidade de infecção aumenta à medida que o sistema imunológico do hospedeiro pode não mais ser capaz de controlar as bactérias em proliferação³⁶. Estudo que analisou a característica microbiológica de 754 UV, por meio de swab em uma área de 1 cm², em uma amostra de 636 (84,3%) pacientes apresentaram úlceras com cultura positiva. Entre os patógenos identificados no estudo, *P. aeruginosa* foram detectadas em 28,6% das culturas¹⁶. Em nosso estudo cerca de 66% das úlceras estavam colonizadas por *S. aureus* e 28,5% por *P. aeruginosa*.

Um grande desafio nas pesquisas e prática clínica de abordagem de úlceras crônicas é ter indicadores para avaliação clínica de infecção local e presença biofilmes. Devido a estas dificuldades, um grupo de *experts* fizeram um consenso internacional sobre este tema publicado em 2019³⁸. Quanto as evidências clínicas de infecção local da ferida, são sugeridos os seguintes indicadores para infecção clássica: eritema, calor local, edema, exsudato purulento, retardo na cicatrização de feridas, dor de surgimento recente ou crescente e aumento do odor. Já os indicadores de infecção oculta (sinais súteis) são: tecido de granulação exuberante ou hipergranulação, granulação friável e sangrante, pontos de epitelização no tecido de granulação, aumento abrupto da ferida, atraso na cicatrização de feridas, dor de surgimento recente ou crescente e aumento do odor³⁸.

Os indicadores clínicos de biofilme na ferida sugeridos no consenso são: falha do tratamento antibiótico adequado, recalcitrância ao tratamento antibiótico apropriado, recorrência de atraso de cicatrização após a interrupção do antibiótico, não responsividade à terapia antimicrobiana, atraso na cicatrização, apesar do tratamento ideal da ferida, aumento de exsudato/umidade, inflamação crônica e eritemas leves, má granulação/hipergranulação friável, sinais secundários de infecção^{39,40}.

Com o objetivo de facilitar a distinção dos sinais clínicos de infecção das úlceras, a regra mnemônica NERDS se apresenta como uma ferramenta para identificação de sinais de colonização crítica e infecção, verificando o atraso na cicatrização, exsudato elevado, tecido de granulação exuberante, tecidos desvitalizados e mau odor. Esse conjunto de fatores sugere colonização crítica e requer tratamento tópico. No entanto, o uso sistemático de escalas é relatado na literatura como uma dificuldade de aplicação comum na prática clínica⁴¹.

Em relação às cepas bacterianas classificadas quanto à produção de biofilme, no presente estudo houve diminuição de úlceras com bactérias produtoras de biofilme em relação T0 ao T30, mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos. As principais bactérias produtoras de biofilmes em úlceras crônicas são *S. aureus* e *P. aeruginosa*¹.

A tipagem molecular, pela técnica PFGE, realizada neste estudo demonstrou elevada similaridade dos clones no T0 e no T30 nas cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Apenas uma úlcera do grupo hidrofibra com prata e três do grupo Colagenase tiveram mudança de clonalidade do *S. aureus*. Não houve mudança da clonalidade da *P. aeruginosa* em nenhuma úlcera de ambos os grupos. Outros estudos fizeram a identificação da clonalidade bacteriana em diferentes momentos. Um estudo realizado com lesões crônicas tratadas com hidrogel a 2% e placa de poliuretano detectou *S. aureus* em 82,9% (29/35 das lesões) dos pacientes em uso de hidrogel e em 100% (8/8 das lesões) dos pacientes em uso de placa de poliuretano. O mesmo estudo identificou que o mesmo padrão se repetiu entre os *S. aureus* coletados em dois momentos diferentes nos mesmos pacientes e que duas amostras de diferentes pacientes apresentaram o mesmo padrão de fragmentação de DNA pelo PFGE⁴². Outro estudo avaliou a colonização de feridas por *P. aeruginosa*, via PFGE, identificou em 48 culturas isoladas de úlceras crônicas que realizaram diferentes tipos de curativos, inclusive com prata, demonstrando multirresistência em três. *P. aeruginosa* estava presente em 75% das amostras de feridas crônicas. Na maioria das úlceras, as cepas apresentaram as mesmas características genéticas nos dois momentos analisados, indicando que os leitos das feridas permaneceram colonizados e que os clones persistiram por mais de um mês de tratamento, resultado

semelhante ao encontrado por nosso estudo. A maioria das bactérias continha genes de virulência que estavam associados com alto potencial para estabelecer infecção⁴³.

Nosso estudo apresenta algumas limitações. O tempo e acompanhamento de 30 dias é considerado insuficiente para avaliar a evolução do processo cicatricial de úlceras crônicas. Contudo, os desfechos primários foram relacionados a avaliação de infecção superficial local e desfechos microbiológicos, os quais podem ser alcançados no período proposto. Outra limitação foi quanto a forma de coleta do material para as análises microbiológicas, pois o padrão outro é a biópsia do tecido, devido a capacidade de avaliar as bactérias que estejam mais profundas, mas tem a desvantagem de ser mais invasivo, doloroso e caro do que a técnica de swab¹⁴. Também o swab foi coletado em uma pequena área do leito da úlceras com característica de tecidos inviáveis, entretanto a distribuição de bactérias de biofilmes em feridas crônicas podem não ser uniformes, de modo que uma única amostra de biópsia ou swab em pequena área pode influenciar nos resultados, pois outras áreas da mesma ferida podem apresentar resultados diferentes.

Os resultados deste estudo possibilitam a reflexão sobre o perfil clínico e microbiológico de UV crônicas e sua resposta a algumas intervenções referidas como estratégias de combate ao biofilme.

5. CONCLUSÃO

Ambas as intervenções, melhoraram as características clínicas e microbiológicas ao longo do tempo, mas não houve diferença entre as duas intervenções após 30 dias de seguimento. A maioria das úlceras não tiveram mudança da identidade bacteriana do *S aureus* e *Paeruginosa* entre T0 e 30, sem diferença entre os grupos.

6. AGRADECIMENTO

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão de bolsa e financiamento do projeto (processo nº: 2020/01768-3).

REFERÊNCIAS DO MANUSCRITO

1. Percival SL, Hill KE, Williams DW, Hooper SJ, Thomas DW, Costerton JW. A review of the scientific evidence for biofilms in wounds. *Wound Repair Regen.* 2012;20(5):647-57.
2. Percival SL, Emanuel C, Cutting KF, Williams DW. Microbiology of the skin and the role of biofilms in infection. *Int Wound J.* 2012;9(1):14-32.
3. Ciofu O, Moser C, Jensen PØ, Høiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2022;1-15.
4. Rendueles O, Ghigo J. Multi-species biofilms: How to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol.* 2012;36(5):972-89.
5. Cutting K, McGuire J. Safe bioburden management. A clinical review of DACC technology. *J Wound Care.* 2015;24(5):S1–S30.
6. Strohal R, Dissemond J, Jordan O'Brien J, et al. EWMA document: Debridement: An updated overview and clarification of the principle role of debridement. *J Wound Care.* 2013;22:S1-S49.
7. Wolcott R, Rumbaugh K, James G, et al. Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *J Wound Care.* 2010;19(8):320-8.
8. Mota MC, Melo SC, Costa TP. Estratégias de gestão de biofilmes em feridas crônicas: uma revisão de literatura. *J Tissue Regen Heal.* 2012;1(1):10-8.
9. Metcalf DG, Parsons D, Bowler PG. Clinical safety and effectiveness evaluation of a new antimicrobial wound dressing designed to manage exudate, infection and biofilm. *Int Wound J.* 2017;14(1):203-13.
10. McCallon SK, Weir D, Lantis JC. Optimizing Wound Bed Preparation With Collagenase Enzymatic Debridement. *J Am Coll Clin Wound Spec.* 2014;6(1-2):14-23.
11. Sibbald R, Woo K, Ayello E. Increased bacterial burden and infection: NERDS and STONES. *Wounds UK.* 2007;3(2):25-46.
12. Santos V, Azevedo M, Silva T, Carvalho V, Carvalho V. Adaptação transcultural do pressure ulcer scale for healing (PUSH) para a língua portuguesa. *Rev Latino-Am Enferm.* 2005;13(3):305-3013.
13. Santos V, Sellmer D, Massulo M. Confiabilidade interobservadores do Pressure Ulcer Scale for Healing (PUSH), em pacientes com úlceras crônicas de perna. *Rev Latino-Am Enfermagem.* 2007;15(3):391-396.
14. Alves PJ, Barreto RT, Barrois BM, Gryson LG, Meaume S, Monstrey SJ. Update on the role of antiseptics in the management of chronic wounds with critical colonisation and/or biofilm. *Int Wound J.* 2021;18(3):342-358.
15. Jørgensen HJ, Mørk T, Rørvik LM. The occurrence of *Staphylococcus aureus* on a farm with small-scale production of raw milk cheese. *J Dairy Sci.* 2005;88(11):3810-7.
16. Cwajda-białasik J, Mościcka P, Jawień A, Szewczyk MT. Microbiological status of venous leg ulcers and its predictors: A single-center cross-sectional study. *Int J Environ Res Public Health.* 2021;18(24):12965.
17. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington: ASM Press; 2007.
18. Stepanovic S, Ćirković I, Mijač V, Švabić-Vlahović M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiol.* 2003;20(3):339-43.

19. Centers for Disease Control and Prevention - CDC. Oxacillinresistant *Staphylococcus aureus* on PulseNet (OPN): laboratory protocol for molecular typing of *S. aureus* by Pulsedfield Gel Electrophoresis (PFGE) [Internet]. Atlanta: CDC; 2019 [citado 28 Jul 2022]. Disponível em: https://www.cdc.gov/mrsa/pdf/ar_mras_PFGE_s_aureus.pdf
20. Namvar AE, Havaei SA, Masoumeh D. Molecular Characterization of *Staphylococcus epidermidis* Isolates Recovered from Patients Admitted to a Referral Hospital in Iran. *Arch Clin Infect Dis*. 2017;12(2):e38675.
21. Selima S, Kholyc IE, Hagagyb N, Alfayb ES, Aziz MA. Rapid identification of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2015;29(1):152-6.
22. Patino CM, Ferreira JC. Intervalos de confiança: Uma ferramenta útil para estimar o tamanho do efeito no mundo real. *J Bras Pneumol*. 2015;41(6):565-6.
23. Margotto PR. Como fazer e interpretar no SPSS. *Esc Super Ciências da Saúde*. 2010.
24. Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ, et al. The prevalence of biofilms in chronic wounds: A systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care*. 2017;26(1):20-5.
25. James GA, Swogger E, Wolcott R, et al. Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen*. 2008;16(1):37-44.
26. Forlee M, Rossington A, Searle R. A prospective, open, multicentre study to evaluate a new gelling fibre dressing containing silver in the management of venous leg ulcers. *Int Wound J*. 2014;11(4):438-45.
27. Norman G, Dumville JC, Westby MJ, Stubbs N, Soares MO. Dressings and topical agents for treating venous leg ulcers (Protocol). *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;(3):CD012583. doi: 10.1002/14651858.CD012583.
28. Coutts P, Sibbald RG. The effect of a silver-containing Hydrofiber® dressing on superficial wound bed and bacterial balance of chronic wounds. *Int Wound J*. 2005;2(4):348-56.
29. Domínguez AV, Algaba RA, Canturri AM, Villodres ÁR, Smani Y. Antibacterial activity of colloidal silver against gram-negative and gram-positive bacteria. *Antibiotics*. 2020;9(1):1-10.
30. Panáček A, Kvítek L, Smékalová M, et al. Bacterial resistance to silver nanoparticles and how to overcome it. *Nat Nanotechnol*. 2018;13(1):65-71.
31. Storm-Versloot MN, Vos CG, Ubbink DT VH, This. Topical silver for preventing wound infection (Review). *Int J Evid Based Healthc*. 2010;9(3):1-110.
32. Norman G, Westby MJ, Rithalia AD, Stubbs N, Soares MO, Dumville JC. Dressings and topical agents for treating venous leg ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;6(6):CD012583.
33. Zhao M, Zhang D, Tan L, Huang H. Silver dressings for the healing of venous leg ulcer: A meta-analysis and systematic review. *Medicine (Baltimore)*. 2020;99(37):e22164.
34. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA, et al. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair Regen*. 2017;25(5):744-57.
35. Metcalf DG, Bowler PG. Biofilm delays wound healing: A review of the evidence. *Burn Trauma*. 2013;1(1):5-12.
36. Percival SL. Importance of biofilm formation in surgical infection. *Br J Surg*. 2017;104(2):e85-e94.
37. Garcia TF, Borges EL, Junho TOC, Spira JAO. Perfil microbiológico das infecções de úlceras de perna: estudo de revisão. *Rev Bras Enferm*. 2021;74(3):1-10
38. Haesler E, Swanson T, Ousey K, Carville K. Clinical indicators of wound infection

- and biofilm: Reaching international consensus. *J Wound Care*. 2019;28(Sup3b):S4-S12.
39. Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco OL. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol*. 2017;73(3):710-21.
 40. Omar A, Wright JB, Schultz G, Burrell R, Nadworny P. Microbial biofilms and chronic wounds. *Microorganisms*. 2017;5(1):1-15.
 41. Borges EL, Oliveira T, Junho DC, Aparecida J, Spira O. Perfil microbiológico das infecções de úlceras de perna: estudo de revisão. *Rev Bras Enferm*. 2021;74(3):1-10.
 42. Barreto BMF. Monitoramento e caracterização molecular de *Staphylococcus aureus* em lesões cutâneas crônicas tratadas com hidrogel e placa de poliuretano [dissertação]. Niterói: Escola de Enfermagem Aurora de Afonso Costa, Universidade Federal Fluminense; 2015.
 43. Oliveira FP, Pires BMFB, Silva KCFA, Carvalho BTF, Teixeira LA, Paula GR, et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and clonal diversity of pseudomonas aeruginosa in chronic wounds. *J Wound Ostomy Continence Nurs*. 2017;44(6):528-35..

5 CONCLUSÕES

- Ambas as intervenções, Hidrofibra com prata e Colagenase, promoveram diminuição de úlceras com critérios de colonização crítica ao longo do tempo, entretanto o risco relativo (RR) para não colonização crítica no T30 foi de 0,81 (IC95% 0,48 – 1,37; $p=0,439$), portanto sem diferença com significância estatística entre os grupos.
- Não houve diminuição da carga bacteriana total ao longo do tempo nos dois grupos ($p= 0,054$) e nem entre os dois grupos de intervenção ($p=0,113$);
- Houve diminuição de úlceras com bactérias produtoras de biofilme em relação T0 ao T30 nos dois grupos ($p= 0,047$), mas sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos no T30 ($p= 0,558$). O RR de úlceras com bactérias não produtoras de biofilme foi de 1,0 (IC95% 0,35 – 2,86; $p > 0,999$);
- Apenas uma úlcera do grupo Hidrofibra com prata e três do grupo Colagenase tiveram mudança de clonalidade do *S aureus*. O RR para ter *S aureus* com mudança de identidade (clonalidade) foi de 0,58 (IC95% 0,10 – 3,31; $p= 0,553$), portanto sem diferença com significância estatística entre os grupos.
- Não houve mudança da clonalidade da *P aeruginosa* em nenhuma úlcera de ambos os grupos.
- A média de redução do escore do PUSH no grupo Hidrofibra com prata foi de - 6,8 (IC 95% -13,0 a - 1,3) e no grupo Colagenase foi de -7,6 (IC95% -14,1 a -1,10), confirmando que não houve diferença entre os grupos.
- A média de redução das áreas no grupo Hidrofibra com prata foi de - 0,78 (IC 95% -0,20 a -1,36) e no grupo Colagenase foi de -1,1 (IC 95% -0,20 a -2,0).
- Não houve eventos adversos considerados relacionados às duas intervenções.

6 TABELAS E FIGURAS SUPLEMENTARES

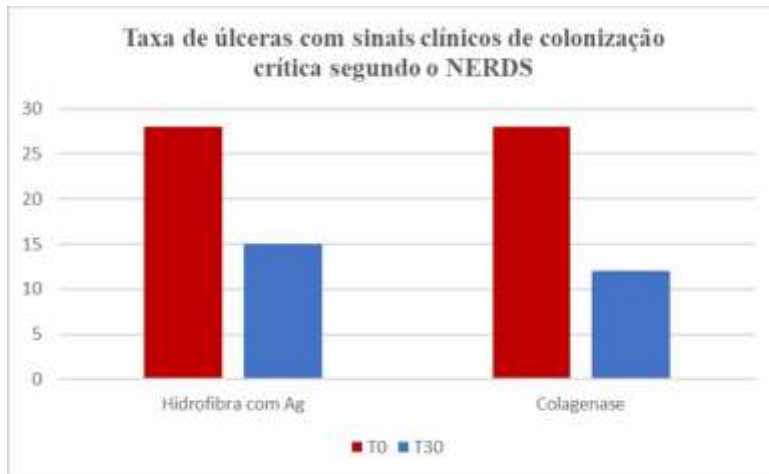


Figura 1: Número de úlceras do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase com sinais clínicos de colonização crítica segundo o NERDS no T0 e T30.

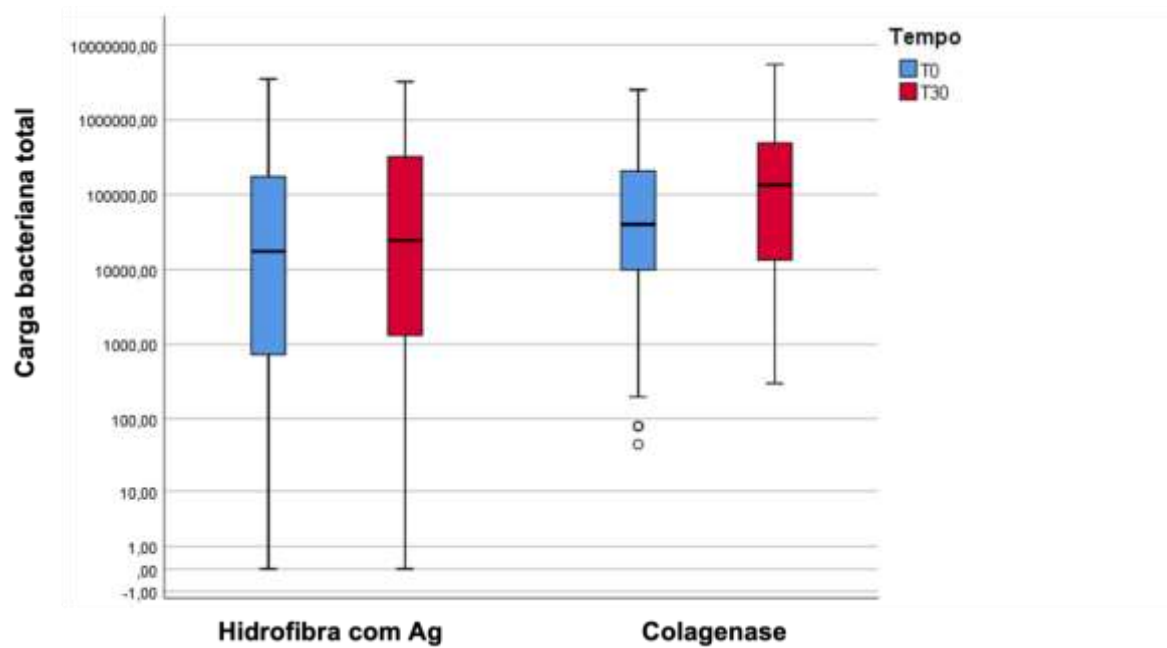


Figura 2: Log da carga bacteriana das espécies avaliadas totais das úlceras no tempo basal (T0) e após 30 dias (T30), nas úlceras do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase.

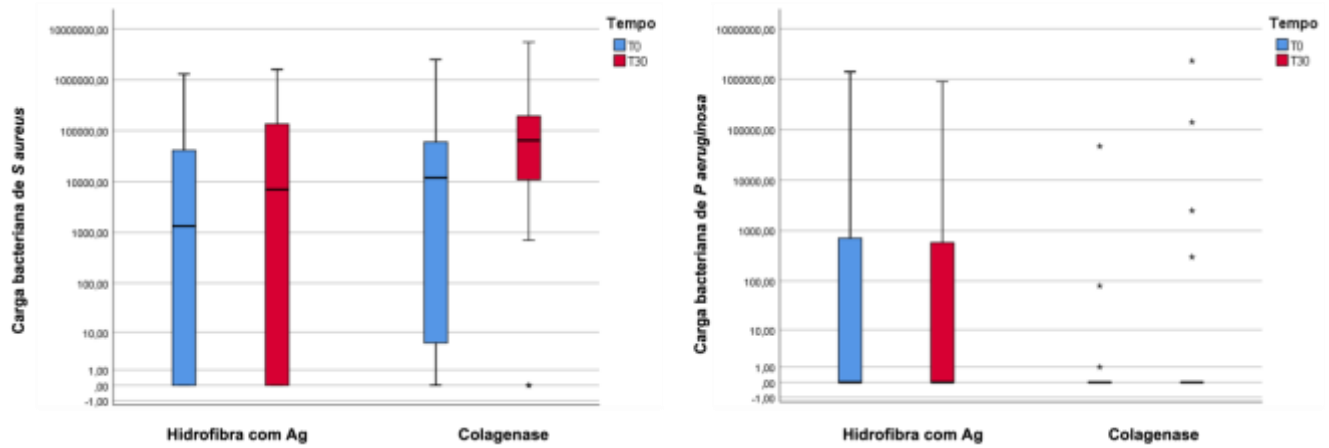


Figura 3: Carga bacteriana de *S. aureus* e *P. aeruginosa* das úlceras no tempo basal (T0) e após 30 dias (T30), do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase.

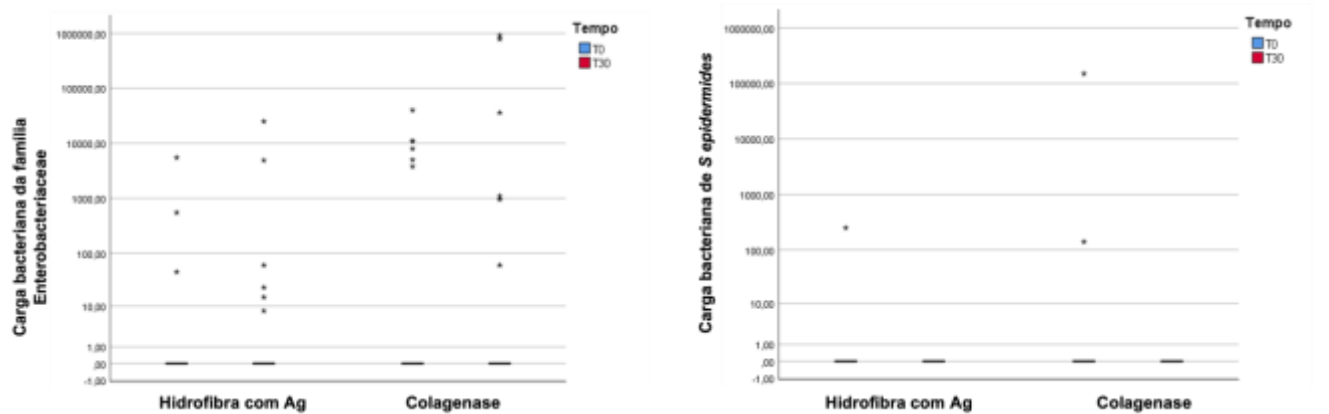


Figura 4: Carga bacteriana da família enterobacteriaceae e *S. epidermidis* das úlceras no tempo basal (T0) e após 30 dias (T30), do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase.

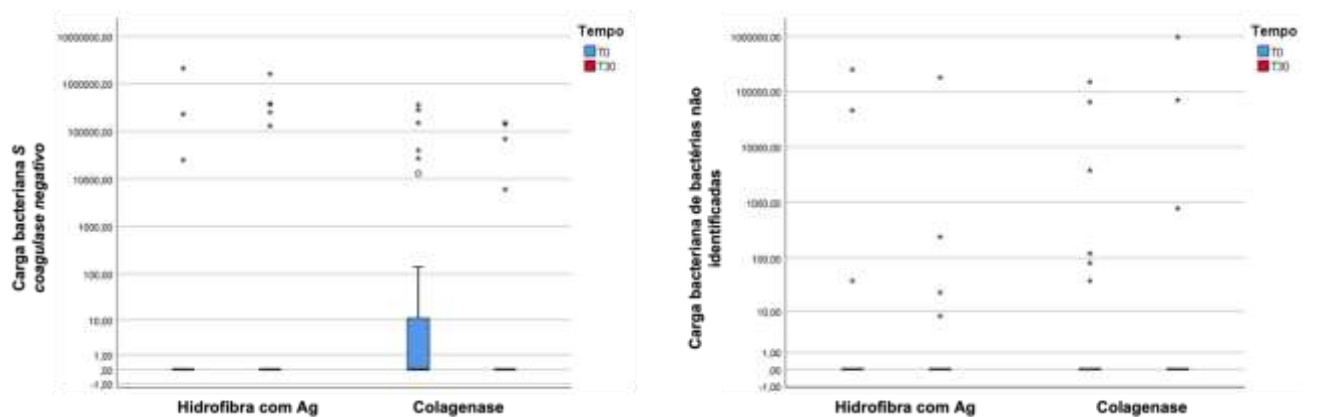


Figura 5: Carga bacteriana *S. coagulase* negativo e de bactérias não identificadas das úlceras no tempo basal (T0) e após 30 dias (T30), do grupo Hidrofibra com prata e Colagenase.

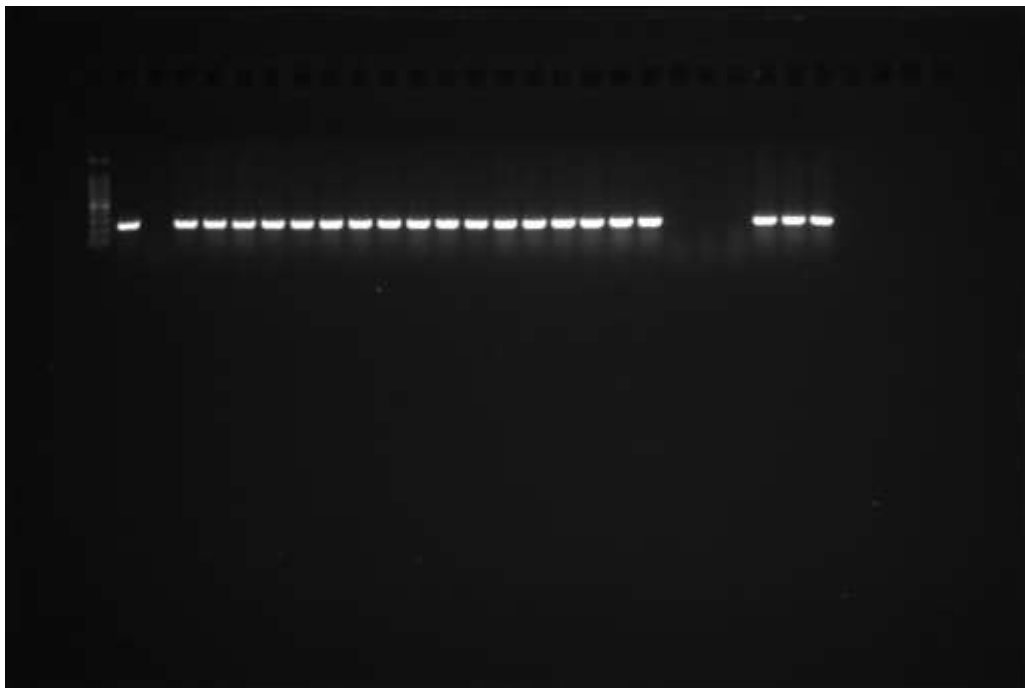


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *oprI* (249 pb). Poços 1: 100 pb DNA ladder; poço 2: controle negativo; poço 3: ATCC 9027; poços 4-26: amostras.

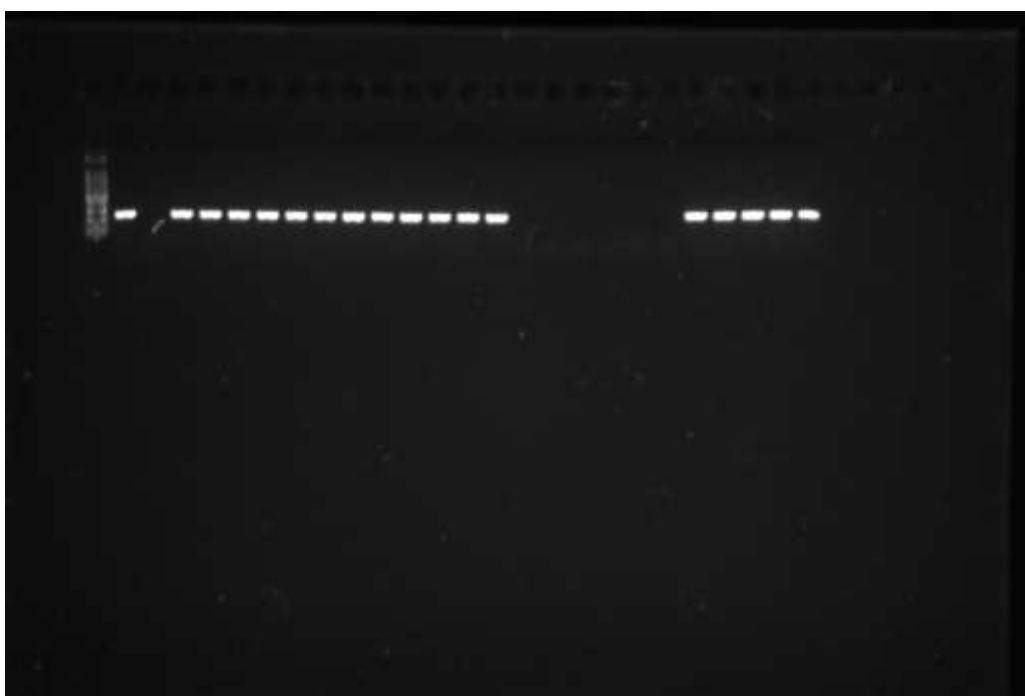


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose para detecção do (a) gene *nuc* (257pb). Poços 1: 100 pb DNA ladder; poço 2: controle negativo; poço 3: ATCC USA300; poços 4-26: amostras.

Tabela 1: Resultados do dendrograma de similaridade genética das úlceras com *S. aureus*.

Paciente	Úlcera	Grupo	Tempo	cluster
1	1	Colagenase	0	0010
1	1	Colagenase	30	0010
1	2	Colagenase	0	0010
1	2	Colagenase	30	0010
2	3	Hidrofibra	0	0002
2	3	Hidrofibra	30	0002
3	1	Colagenase	0	0008
3	1	Colagenase	30	0008
5	1	Hidrofibra	0	0007
5	1	Hidrofibra	30	0007
6	1	Colagenase	0	0004
6	1	Colagenase	30	0004
8	1	Hidrofibra	0	0009
8	1	Hidrofibra	30	0009
9	1	Hidrofibra	0	0002
9	1	Hidrofibra	30	0002
11	1	Colagenase	0	0001
11	1	Colagenase	30	0001
11	2	Colagenase	0	0001
11	2	Colagenase	30	0001
13	1	Hidrofibra	0	0005
13	1	Hidrofibra	30	0005
14	1	Colagenase	0	0006
14	1	Colagenase	30	0006
14	2	Colagenase	0	0006
14	2	Colagenase	30	0006
15	1	Hidrofibra	0	0003
15	1	Hidrofibra	30	0003
15	2	Hidrofibra	0	0003
15	2	Hidrofibra	30	0003
15	3	Hidrofibra	0	0003
15	3	Hidrofibra	30	0003
16	1	Hidrofibra	0	0007
16	1	Hidrofibra	30	0007
17	1	Colagenase	0	0016
17	1	Colagenase	30	0016
19	1	Colagenase	0	0002
19	1	Colagenase	30	0002
20	1	Colagenase	0	0003
20	1	Colagenase	30	0003
20	2	Colagenase	0	0003
20	2	Colagenase	30	0003
22	1	Colagenase	0	0017
22	1	Colagenase	30	0017
22	2	Colagenase	0	0015
22	2	Colagenase	30	0015

Paciente	Úlcera	Grupo	Tempo	cluster
22	3	Colagenase	0	0015
22	3	Colagenase	30	0015
22	4	Colagenase	0	0015
22	4	Colagenase	30	0015
24	1	Hidrofibra	0	0001
24	1	Hidrofibra	30	0001
26	1	Hidrofibra	0	0015
26	1	Hidrofibra	30	0015
27	1	Hidrofibra	0	0013
27	1	Hidrofibra	30	0013
29	2	Hidrofibra	0	0005
29	2	Hidrofibra	30	0006
30	1	Colagenase	0	0008
30	1	Colagenase	30	0010
30	2	Colagenase	0	0008
30	2	Colagenase	30	0010
30	3	Colagenase	0	0008
30	3	Colagenase	30	0010
30	4	Colagenase	0	0010
30	4	Colagenase	30	0010
31	1	Hidrofibra	0	0011
31	1	Hidrofibra	30	0011
32	1	Hidrofibra	0	NI
32	1	Hidrofibra	30	NI

Tabela 2: Resultados do dendrograma de similaridade genética das úlceras com *P. aeruginosa*.

Paciente	Úlcera	Grupo	Tempo	Cluster
9	1	Hidrofibra	0	0003
9	1	Hidrofibra	30	0003
10	1	Hidrofibra	0	0005
10	1	Hidrofibra	30	0005
14	1	Hidrofibra	0	0004
14	1	Hidrofibra	30	0004
14	2	Hidrofibra	0	0004
14	2	Hidrofibra	30	0004
18	1	Colagenase	0	0007
18	1	Colagenase	30	0007
20	2	Colagenase	0	0006
20	2	Colagenase	30	0006
25	1	Hidrofibra	0	0008
25	1	Hidrofibra	30	0008
25	2	Hidrofibra	0	0008
25	2	Hidrofibra	30	0008
29	1	Hidrofibra	0	0002
29	1	Hidrofibra	30	0002
29	3	Hidrofibra	0	0001
29	3	Hidrofibra	30	0001
29	4	Hidrofibra	0	0001
29	4	Hidrofibra	30	0001

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa **“HIDROFIBRA COM PRATA VERSUS COLAGENASE NO CONTROLE DA COLONIZAÇÃO CRÍTICA EM ÚLCERAS VENOSAS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO”** que pretende avaliar a ação do desbridamento cirúrgico superficial associado ao curativo hidrofibra com prata, após 30 dias, no controle da infecção superficial e do biofilme em pacientes com úlcera venosa durante o tratamento no Ambulatório de Úlceras Crônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP).

Será realizado a limpeza de sua ferida com soro fisiológico 0,9%, *swab* de região delimitada da úlcera e coleta de amostra para análise das bactérias. Será realizado 2 grupos, grupo 1 de pacientes com úlceras venosas tratados com curativo hidrofibra com prata e terapia compressiva e o grupo 2 será de pacientes com úlceras venosas tratados com curativo de collagenase e terapia compressiva. Todos os curativos serão totalmente fornecidos pelo projeto. Esses curativos são formas já utilizadas para tratamento de úlceras venosas. Realizara esse curativo durante 30 dias, sendo que no último dia, caso não cicatrização da úlcera, será realizado novo desbridamento para nova análise das bactérias.

Os riscos da sua participação serão avaliados através do surgimento de eventos adversos locais, por ser relacionado a tratamento tópico local. Os benefícios nos dois grupos serão tratados com terapia compressiva, considerado padrão ouro para úlcera venosa proporcionando oportunidade de cicatrização das úlceras de ambos os grupos. Todos os esclarecimentos necessários serão dados e lhe asseguramos que o seu nome não será divulgado, sendo mantido o mais rigoroso sigilo através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo (la).

Informamos que você pode se recusar a participação em qualquer momento, sem que isso traga constrangimento ou prejuízo ao seu tratamento e a sua recuperação. Os resultados da pesquisa serão divulgados em publicações posteriores à finalização do estudo. Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão sobre a guarda da pesquisadora. Caso autorize a participação, você receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608/1609.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA**Identificação do paciente:**

Assinatura: _____

Data: ____/____/____

Assinatura: _____

Taís Lopes Saranholi

Orientadora: Luciana Patrícia Fernandes Abbade, Fone: (14) 99671-8694. Email: lfabbade@fmb.unesp.brPesquisadora: Taís Lopes Saranholi: (14) 99720-0079. E-mail: tais_saranholi@hotmail.com

APÊNDICE II – CARACTERIZAÇÃO DE FERIDAS CRÔNICAS DOS MEMBROS INFERIORES

FICHA CLÍNICA

Data da coleta: _____

Iniciais: _____

DN: _____ Idade: _____ anos

Sexo: ()M ()F

Cidade: _____

Ocupação atual: _____

1. Antecedentes pessoais

() HAS (hipertensão arterial sistêmica)

() DM (diabetes mellitus)

Outras comorbidades: _____

2. Medicação de uso contínuo

Drogas Flebotônicas: _____

3. Histórico cirúrgico

Histórico de procedimento em veias varicosas:

() Cirurgia () espuma () Radio frequência

Cirurgia vascular: _____

CARACTERIZAÇÃO DA ÚLCERA VENOSA NO T0

1. Experiências com o tratamento da úlcera

História de trombose venosa profunda (TVP) pregressa no(s) membro(s) inferior(es) acometido(s):

1-() não 2-() sim

2. Faz tratamento da ferida?

1-() não 2-() sim Quantos meses: _____

3. Curativo utilizado no momento: _____

4. Apresentou alergias a algum curativo realizado:

1-() não 2-() sim _____

5. Foi feita imagem digital?

1-() não 2-() sim

6. Características da úlcera:

() MID:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
TEMPO (1)					
REGIÃO (2)					
LEITO (3)					
EXSUDAÇÃO (4)					
QUANTIDADE (5)					
CARACTERÍSTICAS (6)					
DOR (7)					
INTENSIDADE (8)					

() MIE:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
TEMPO (1)					
REGIÃO (2)					
LEITO (3)					
EXSUDAÇÃO (4)					
QUANTIDADE (5)					
CARACTERÍSTICAS (6)					
DOR (7)					
INTENSIDADE (8)					

Legendas:**Cicatrização:** 1- não 2- sim**1) Tempo da úlcera aberta em meses****2) Região do membro acometida:** 1-Região medial da perna; 2-Região lateral da perna; 3-Pré-tibial; 4-Posterior; 5-Dorso do pé; 6-Região medial do pé; 7-Região lateral do pé;**3) Leito:** 1-bom tecido de granulação; 2-tecido vermelho opaco e friável; 3-amarelado; 4-necrose; 5-vinhoso; 6-esverdeado**4) Exsudação:** 1- Ausente; 2-Presente**5) Quantidade:** 1-pequena; 2- média; 3- grande**6) Característica:** 1- serosa; 2- purulenta; 3- sanguinolenta.**7) Dor:** 1- Ausente; 2-Presente**8) Intensidade da dor** (se presente): de acordo com a EVN abaixo



0=ausente; 1 a 3=dor de fraca intensidade; 4 a 6=dor de intensidade moderada; 7 a 9=dor de forte intensidade; 10=dor de intensidade insuportável.

7- Características do membro afetado por úlcera:

Número de úlceras Características	MID	MIE
PULSO PEDIOSO (1)		
ÍNDICE TORNOZELO-BRAÇO (ITB)		
MOBILIDADE DO TORNOZELO		
LIPODERMATOESCLEROSE		
DERMATITE OCRE		
ECZEMA		

8- Avaliação infecção superficial das UV (NERDS) (T0)

() MID:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
Úlceras não cicatrizantes (1)					
Exsudativas (2)					
Tecido de granulação (3)					
Detritos (tecido necrótico amarelo ou preto na superfície da ferida) (4)					
Cheiro ou odor desagradável da úlcera (5)					

() MIE:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
Úlceras não cicatrizantes (1)					
Exsudativas (2)					
Tecido de granulação (3)					
Detritos (tecido necrótico amarelo ou preto na superfície da ferida) (4)					
Cheiro ou odor desagradável da úlcera (5)					

() *Úlceras não cicatrizantes (N= Nonhealing wounds)*() *Exsudativas (E= Exudative wounds)*() *Tecido de granulação de superfície de úlcera vermelho e sangrento (R= Red and bleeding wound surface granulation tissue)*() *Detritos (tecido necrótico amarelo ou preto na superfície da ferida) (D= Debris (yellow or black necrotic tissue) on the wound surface)*() *Cheiro ou odor desagradável da úlcera (S= Smell or unpleasant odor from the wound)***9- Avaliação da melhora clínica das UV (Escala PUSH) (T0)**

() MID:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
COMPRIMENTO X LARGURA					
QUANTIDADE EXSUDATO					
TIPO DE TECIDO					
TOTAL:					

() MIE:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
COMPRIMENTO X LARGURA					
QUANTIDADE EXSUDATO					
TIPO DE TECIDO					
TOTAL:					

Legenda:

CARACTERIZAÇÃO DA ÚLCERA VENOSA NO T30

Iniciais: _____

DN: _____

1. Experiência durante a pesquisa**1.1 Realizado nova imagem digital?** () sim () não**1.2 Houve algum evento adverso durante o estudo:** () sim () não**2. Eventos adversos locais:** () sim () não

1-ausente; 2-dor; 3-maceração da borda da úlcera; 4-eczema; 5-infecção local (erisipela, celulite, linfangite). 6- Outros

(descrever): _____

3. Eventos adversos sistêmicos: () sim () não

1 = ausente; 2 = presente

Quando presente (descrever o tipo, semana de tratamento, início (data), término (data)).

Evento: () esperado () inesperado

Intensidade do evento: () leve () moderado () grave

Relação causal: () provável () possível, () remota () não relacionado

Terapêutica:

Medicação indicada:

4. Frequência da utilização da faixa elástica: () sempre () as vezes () nunca**5. Frequência da utilização do curativo:** () sempre () as vezes () nunca**6. Características da úlcera:**

() MID:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
TEMPO (1)					
REGIÃO (2)					
LEITO (3)					
EXSUDAÇÃO (4)					
QUANTIDADE (5)					
CARACTERÍSTICAS (6)					
DOR (7)					
INTENSIDADE (8)					

() MIE:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
TEMPO (1)					
REGIÃO (2)					
LEITO (3)					
EXSUDAÇÃO (4)					
QUANTIDADE (5)					
CARACTERÍSTICAS (6)					
DOR (7)					
INTENSIDADE (8)					

Legendas:

Cicatrização: 1- não 2- sim

1) Tempo da úlcera aberta em meses

2) Região do membro acometida: 1-Região medial da perna; 2-Região lateral da perna; 3-Pré-tibial; 4-Posterior; 5-Dorso do pé; 6-Região medial do pé; 7-Região lateral do pé;

3) Leito: 1-bom tecido de granulação; 2-tecido vermelho opaco e friável; 3-amarelado; 4-necrose; 5-vinhoso; 6-esverdeado

4) Exsudação: 1- Ausente; 2-Presente

5) Quantidade: 1-pequena; 2- média; 3- grande

6) Característica: 1- serosa; 2- purulenta; 3- sanguinolenta.

7) Dor: 1- Ausente; 2-Presente

8) Intensidade da dor (se presente): de acordo com a EVN abaixo



0=ausente; 1 a 3=dor de fraca intensidade; 4 a 6=dor de intensidade moderada; 7 a 9=dor de forte intensidade; 10=dor de intensidade insuportável.

8- Avaliação infecção superficial das UV (NERDS) (T0)

() MID:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
Úlceras não cicatrizantes (1)					
Exsudativas (2)					
Tecido de granulação (3)					
Detritos (tecido necrótico amarelo ou preto na superfície da ferida) (4)					
Cheiro ou odor desagradável da úlcera (5)					

() MIE:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
Úlceras não cicatrizantes (1)					
Exsudativas (2)					
Tecido de granulação (3)					
Detritos (tecido necrótico amarelo ou preto na superfície da ferida) (4)					
Cheiro ou odor desagradável da úlcera (5)					

() Úlceras não cicatrizantes (N= Nonhealing wounds)

() Exsudativas (E= Exudative wounds)

() Tecido de granulação de superfície de úlcera vermelho e sangrento (R= Red and bleeding wound surface granulation tissue)

() Detritos (tecido necrótico amarelo ou preto na superfície da ferida) (D= Debris (yellow or black necrotic tissue) on the wound surface)

() Cheiro ou odor desagradável da úlcera (S= Smell or unpleasant odor from the wound)

9- Avaliação da melhora clínica das UV (Escala PUSH) (T0)

() MID:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
COMPRIMENTO X LARGURA					
QUANTIDADE EXSUDATO					
TIPO DE TECIDO					
TOTAL:					

() MIE:

Número de úlceras Características	ÚLCERA 1	ÚLCERA 2	ÚLCERA 3	ÚLCERA 4	ÚLCERA 5
COMPRIMENTO X LARGURA					
QUANTIDADE EXSUDATO					
TIPO DE TECIDO					
TOTAL:					

Legenda:

COMPRIMENTO X LARGURA	0 0 cm²	1 <0,3 cm²	2 0,3-0,6 cm²	3 0,7-1,0 cm²	4 1,1-2,0 cm²	5 2,1-3,0 cm²	6 3,1-4,0 cm²	7 4,1-8,0 cm²	8 8,1-12,0 cm²	9 12,1- 24,0 cm²	10 >24,0 cm²
QUANTIDADE EXSUDATO	0 Ausente	1 Pequena	2 Modera da	3 Grande							
TIPO DE TECIDO	0 Ferida Fechada	1 Tecido Epitelial	2 Tecido de Granula ção	3 Esfacel o	4 Tecido Necrótico						
TOTAL:											

APÊNDICE III – ORIENTAÇÕES DE CURATIVO

Orientações de curativo para participantes da pesquisa “*Hidrofibra com prata versus colagenase para tratamento da colonização crítica em úlceras venosas: ensaio clínico randomizado*”

Identificação do participante:

-
- Antes de iniciar o curativo realize a lavagem das mãos;
 - Expor a lesão e o material o mínimo de tempo possível;
 - Caso as gazes estiverem aderidas na ferida, umedecê-las antes de retirá-las;
 - Realizar a limpeza do local com soro fisiológico 0,9%;
 - Após a limpeza realize a aplicação da pomada Colagenase no local da lesão;
 - Oclua a lesão com gase e faixa;
 - Colocar a faixa elástica, conforme orientação em ambulatório;
 - Após a finalização realize a lavagem das mãos;
 - Realize o curativo diariamente.

Data: ____/____/____ Assinatura: _____

Orientadora: Luciana Patrícia Fernandes Abbade, Fone: (14) 99671-8694. Email: lfabbade@fmb.unesp.br
Pesquisadora: Taís Lopes Saranholi: (14) 99720-0079. E-mail: tais_saranholi@hotmail.com



Orientações de curativo para participantes da pesquisa “Hidrofibra com prata versus colagenase para tratamento da colonização crítica em úlceras venosas: ensaio clínico randomizado”

Identificação do participante: _____

Troca de curativo secundário:

- Antes de iniciar o curativo realize a lavagem das mãos;
- Expor o material o mínimo de tempo possível;
- Retire as gases presentes na lesão cuidadosamente, não retirando a placa do curativo de Hidrofibra;
- Oclua a lesão com gase e faixa;
- Colocar a faixa elástica, conforme orientação em ambulatório;
- Após a finalização realize a lavagem das mãos;
- Realize esse curativo diariamente.

Troca de curativo primário:

- Antes de iniciar o curativo realize a lavagem das mãos;
- Expor a lesão e o material o mínimo de tempo possível;
- Caso as gazes estiverem aderidas na ferida, umedecê-las antes de retirá-las;
- Realizar a limpeza do local com soro fisiológico 0,9%;
- Após a limpeza coloque a placa de Hidrofibra no local da lesão;
- Oclua a lesão com gase e faixa;
- Colocar a faixa elástica, conforme orientação em ambulatório;
- Após a finalização realize a lavagem das mãos;
- Realize esse curativo semanalmente.

Programação de troca de curativo: _____

Dias de troca: _____

Intercorrências: _____

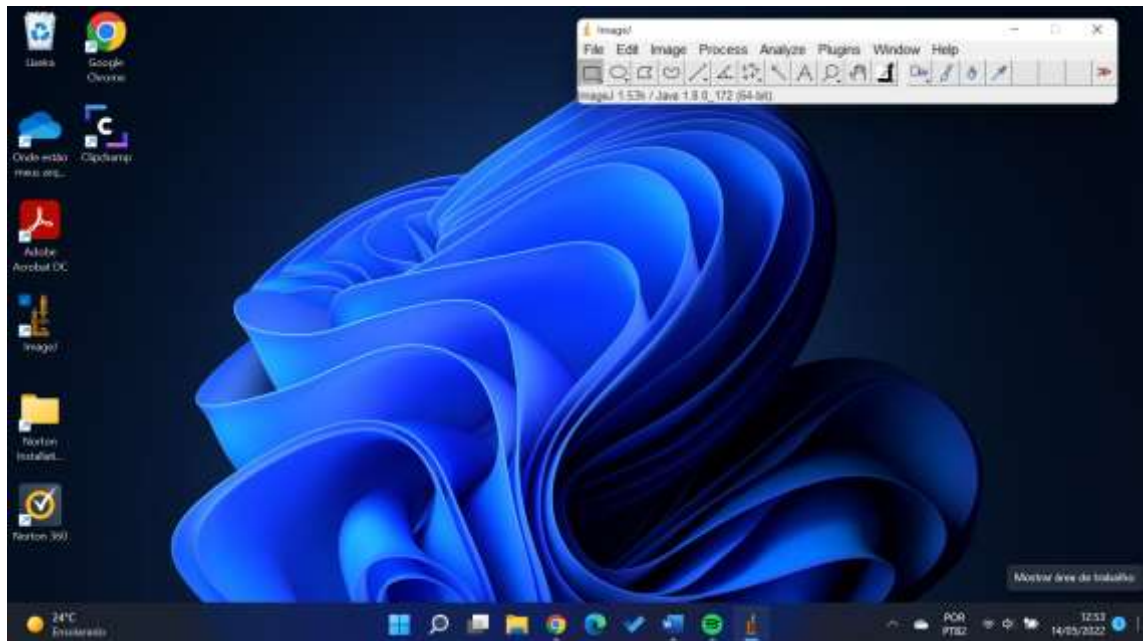
Data: ____/____/____ Assinatura: _____

Orientadora: Luciana Patrícia Fernandes Abbade, Fone: (14) 99671-8694. Email: lfabbade@fmb.unesp.br
Pesquisadora: Taís Lopes Saranholi: (14) 99720-0079. E-mail: tais_saranholi@hotmail.com

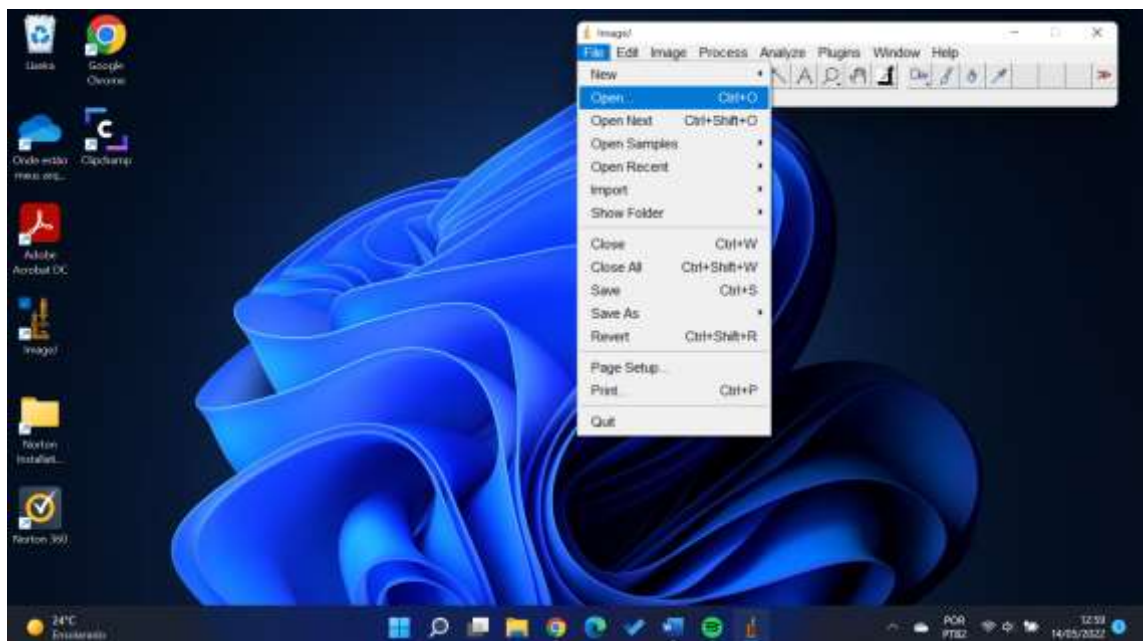
APÊNDICE IV – TUTORIAL PARA MEDIDAS DA ÁREA DA ÚLCERA

Tutorial: obtenção das medidas das úlceras com o programa *Imagem J*

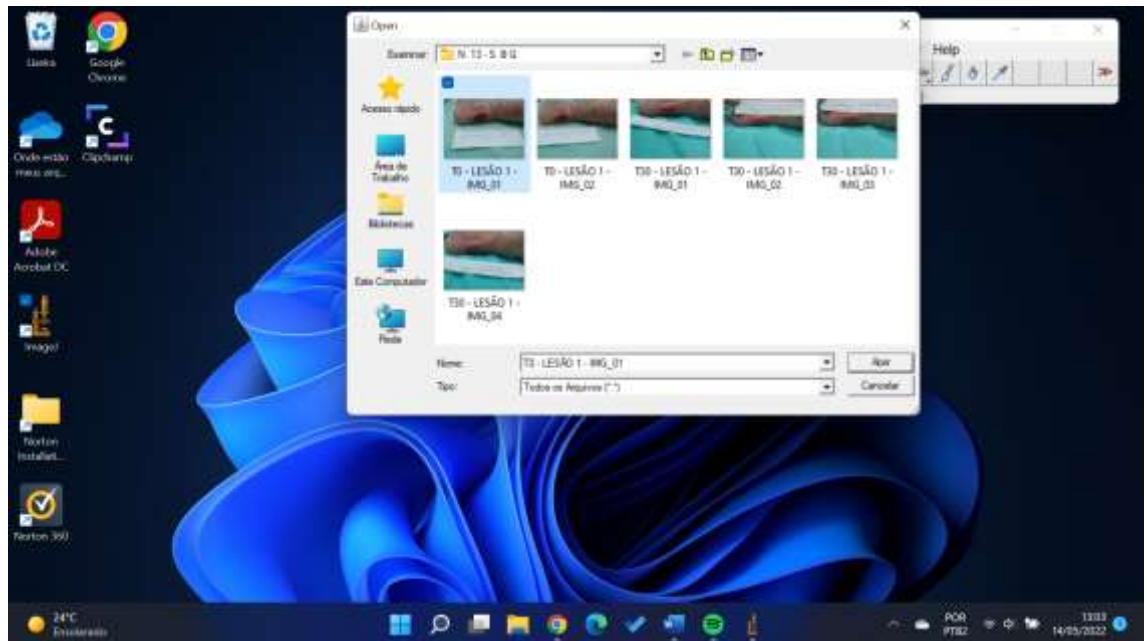
1. Primeiro, clicamos no ícone do programa na área de trabalho e abrimos a aba do Imagem J, que se encontra na região superior direita da foto abaixo.



2. Em seguida, selecionamos a imagem com a úlcera, cuja área desejamos medir, em nosso banco de fotos clicando em “File” e em “Open”.



3. Selecionamos a imagem desejada:

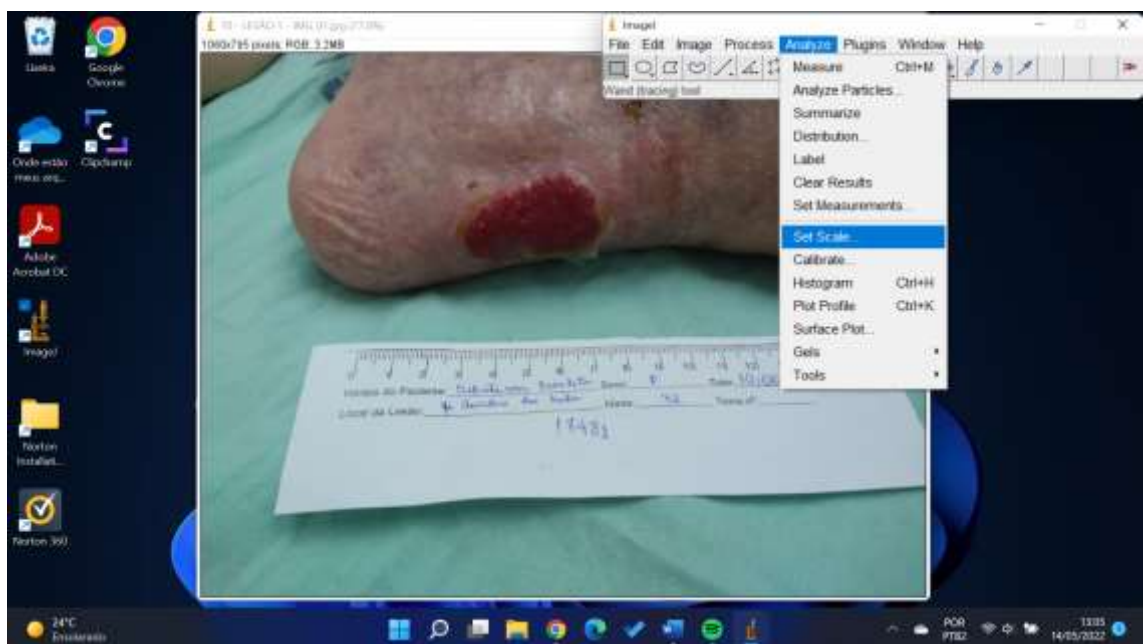


4. Com a imagem aberta, utilizamos a régua da foto para fazer um traço que equivale a 1 cm.

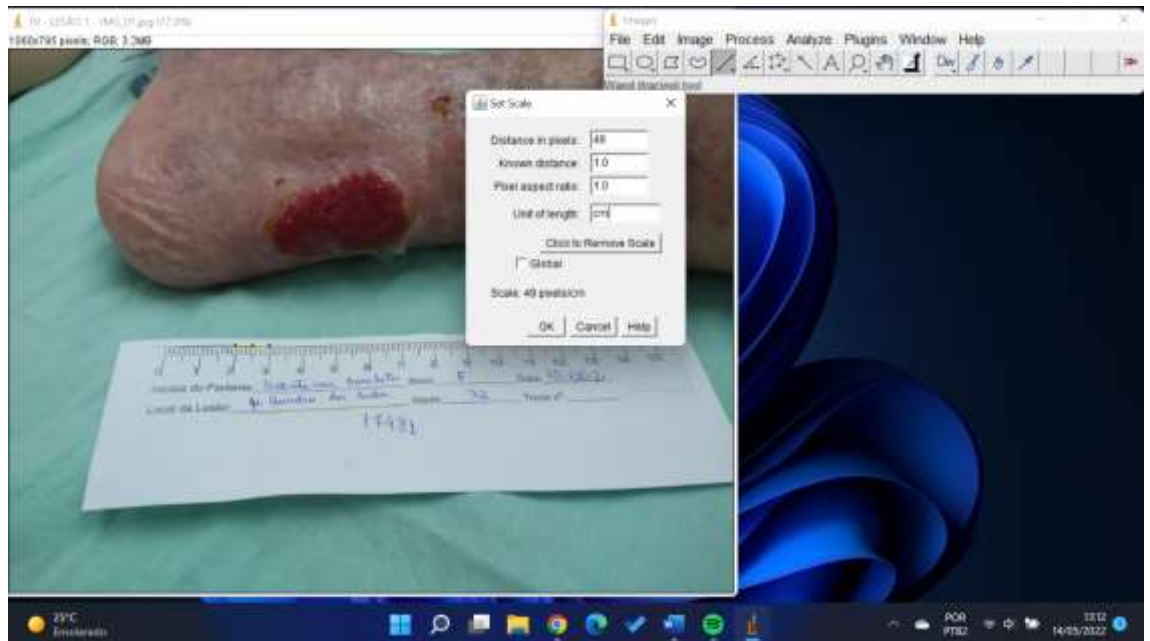




5. Com o traço de 1 cm, clicamos em “Analyze” e depois em “Set scale” para estabelecer as escalas de medida, ou seja, quantos pixels medidos com o traço na etapa 4 equivalem a 1 cm na foto em questão.



6. Em “Set Scale”, definimos quantos pixels na foto equivalem a 1 cm. Em “Distance in pixels” está a distância medida com o traço feito nas etapas anteriores. Estabelecemos a distância conhecida (“Known distance”), que é a medida do traço feito na régua da imagem, como 1 cm. Definimos a proporção de pixel (“Pixel Aspect Ratio”) como 1.0 e a unidade de medida como “cm”. Assim, a escala no exemplo ficou 49 pixels/cm.

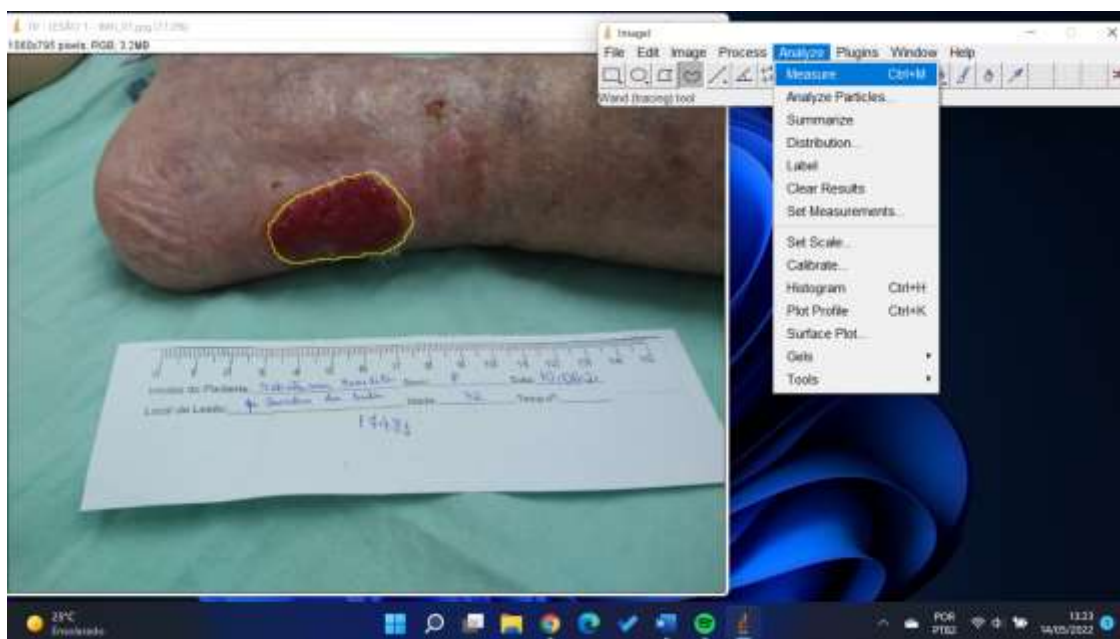


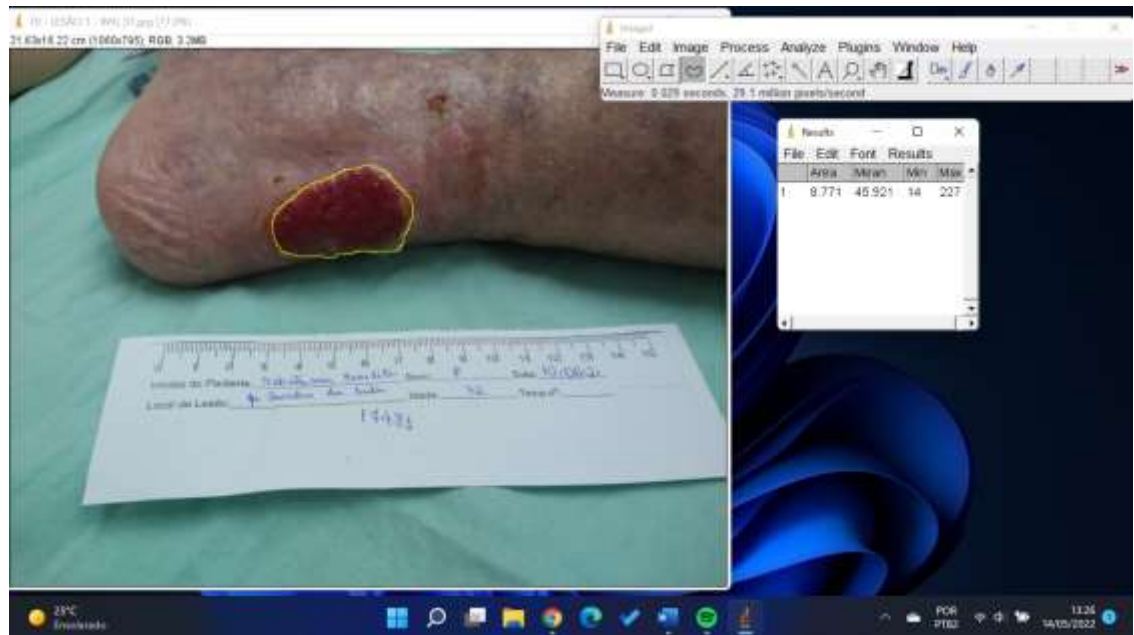
7. Com a escala pronta, clicamos no ícone indicado a seguir e contornamos a úlcera para o cálculo da área.





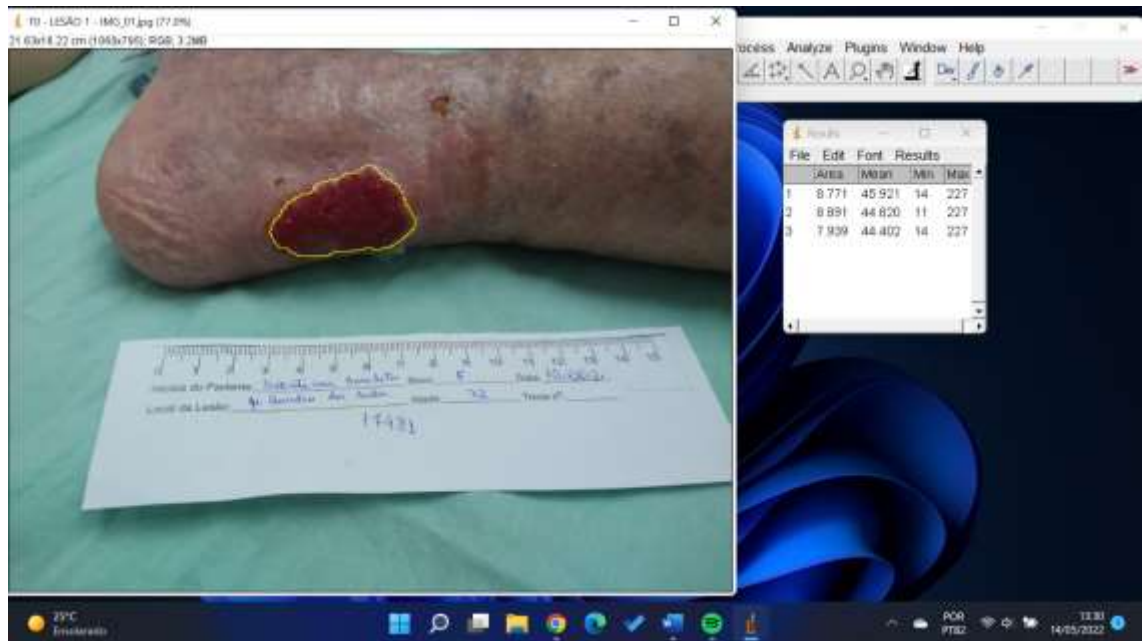
8. Para medir a área da úlcera, clicamos em “Analyze” e depois em “Measure”. O programa abre uma guia e insere a área calculada.



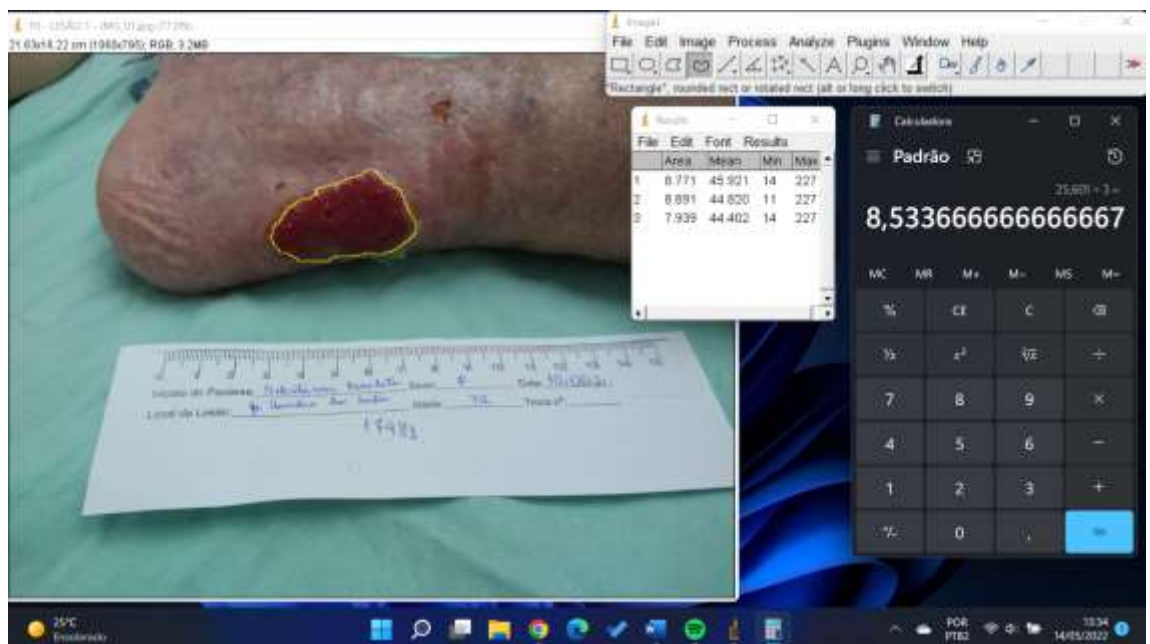


9. Em seguida, com a mesma escala, repetimos o processo de contornar a úlcera duas vezes e calculamos a área mais duas vezes.





10. Por fim, fizemos a média aritmética das três áreas obtidas no programa Imagem J.

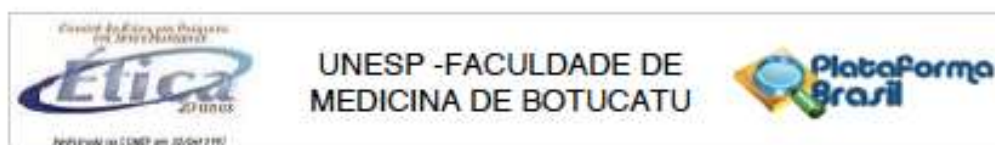


APÊNDICE V – ESCALA DE PRESSURE ULCER SCALE FOR HEALING (PUSH)

Aplicação da escala de PUSH⁵⁵:

COMPRIIMENTO X LARGURA	0 0 cm²	1 <0,3 cm²	2 0,3-0,6 cm²	3 0,7-1,0 cm²	4 1,1-2,0 cm²	5 2,1-3,0 cm²	6 3,1-4,0 cm²	7 4,1-8,0 cm²	8 8,1-12,0 cm²	9 12,1- 24,0 cm²	10 >24,0 cm²
QUANTIDADE EXSUDATO	0 Ausente	1 Pequena	2 Modera da	3 Grande							
TIPO DE TECIDO	0 Ferida Fechada	1 Tecido Epitelial	2 Tecido de Granula ção	3 Esfacel o	4 Tecido Necrôti co						
TOTAL:											

ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: HIDROFIBRA COM PRATA VERSUS COLAGENASE NO CONTROLE DE INFECÇÃO SUPERFICIAL E BIOFILMES DE ÚLCERAS VENOSAS: ENSAIO CLÍNICO RANDOMIZADO

Pesquisador: Talis Lopes Saranholl

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 01680718.5.0000.5411

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.055.504

Apresentação do Projeto:

As úlceras venosas (UV) é a causa mais comum das úlceras de membros inferiores, ocasionando além do impacto socioeconômico, grande repercussão na piora da qualidade de vida, reduzindo a capacidade de participação social e desenvolvimentos de atividades profissionais das pessoas por ela acometidas. Seu prognóstico é ruim devido cicatrização demorada e surgimento de úlceras recorrentes. Assim como as UV, todas as úlceras crônicas são colonizadas por diversas bactérias. Alguns desses microrganismos têm a capacidade de se agruparem em meio à matriz extracelular na superfície do tecido em que se encontram, formando o biofilme. O biofilme pode dificultar a cicatrização, e predispor a infecção superficial e profunda. Algumas intervenções são propostas para combater os biofilmes de úlceras crônicas, visando promover a cicatrização.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar a ação do curativo hidrofibra com prata comparado ao curativo com colagenase, ambos após desbridamento cirúrgico superficial, no controle da infecção superficial e do biofilme em pacientes com UV durante o período de 30 dias.

Objetivo Secundário:

- (1) Determinar a prevalência de biofilme nas UV;
- (2) Determinar o perfil microbiológico antes e após o desbridamento associado ao curativo hidrofibra com prata e colagenase das UV, por meio dos seguintes métodos: sonicação e

Endereço: Chácara Butignoli, s/n

Bairro: Rubião Junior

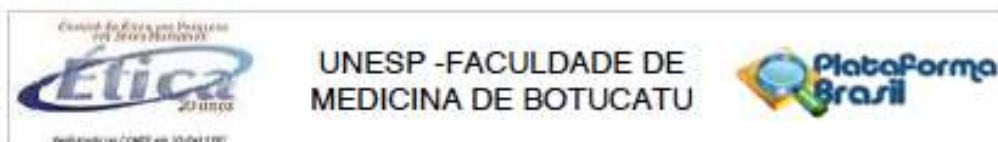
CEP: 18.618-970

UF: SP

Município: BOTUCATU

Telefone: (14)3880-1600

E-mail: osp@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.055.504

microscopia focal;

(3) Descrever a evolução clínica (taxa de cicatrização e diminuição da área ulcerada) após o desbridamento associado ao curativo hidrofibra com prata e o curativo com colagenase.

(4) Avaliar se há correlação entre os achados clínicos de suspeita de biofilme no leito a úlcera com as análises microbiológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Trata-se de um estudo tipo ensaio clínico controlado, randomizado, paralelo, aberto e, que será realizado no Ambulatório de Úlceras Crônicas do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP) com os pacientes que se encaixarem nos critérios de inclusão e exclusão do estudo. Está prevista a participação de 54 pessoas, que serão distribuídas em 2 grupos: 27 no Grupo 1: composto por participantes tratados com o curativo de hidrofibra com prata (AQUACEL® Ag+ Extra™), na forma de placa com troca quando atingir a sua saturação (aproximadamente quatro dias); e outros 27 participantes no Grupo 2, os participantes serão tratados com curativo de Colagenase não associada a antibióticos (Kollagenase®) com troca uma vez ao dia.

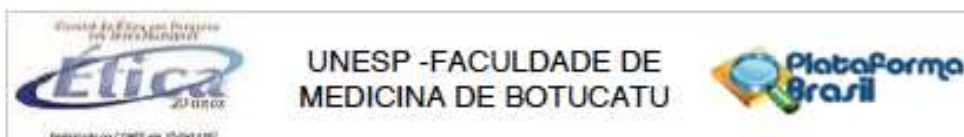
Todos os participantes serão os pacientes adultos que forem atendidos no Ambulatório de Úlceras Crônicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP) no período da pesquisa, estando dentro dos critérios de inclusão do estudo, isto é Ter idade maior ou igual de 18 anos;

- Apresentar UV crônica (úlceras abertas superior a 6 semanas) com sinais clínicos de infecção superficial (colonização crítica) segundo os critérios da regra mnemônica NERDS28. Todos participantes incluídos no estudo serão submetidos no tempo basal (T0) a limpeza da úlcera com soro fisiológico (SF) 0,9% e ao desbridamento cirúrgico superficial do leito de sua(s) úlcera(s). Este procedimento será realizado com anestesia tópica local (creme contendo

lidocaína 4%) mantido sob oclusão por 30 min. Após esse tempo será realizado o desbridamento, por médico dermatologista, com cureta em todo o leito ulcerado. Posteriormente este material será enviado para análise microbiológica. Após o desbridamento, os participantes serão randomizados em 2 grupos. O grupo 1 ou grupo Hidrofibra com prata será composto por participantes tratados com o curativo de hidrofibra com prata (AQUACEL® Ag+ Extra™), na forma de placa com troca quando atingir a sua saturação (aproximadamente quatro dias). No grupo 2, os participantes serão tratados com curativo de Colagenase não associada a antibióticos

(Kollagenase®) com troca uma vez ao dia. O tempo estimado de tratamento para ambos os grupos será de 30 dias. Após desbridamento no T0 e T30 o material coletado será enviado ao laboratório de microbiologia em recipientes estéreis e devidamente identificados. As amostras serão submetidas aos testes de sonicação e microscopia eletrônica confocal. A sonicação consiste em

Endereço: Chácara Butignoli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1609	E-mail: osp@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.055.504

uma técnica, onde baseia-se na formação de microbolhas, utilizando um ultrassom de baixa frequência e Intensidade, que consegue romper o biofilme sem a destruição bacteriana, permitindo a viabilidade das culturas³². A microscopia eletrônica confocal é um microscópio óptico que se baseia no uso de compostos fluorescentes que quando ligados a estruturas específicas, determinam sua localização celular. Capaz de captar apenas a porção do espécime situada no ponto focal de lente mais próxima. Através das imagens bidimensionais muito definidas, é possível obter seções virtuais da espessura do tecido e criar imagens tridimensionais³³.

Riscos: Os riscos da sua participação serão avaliados através do surgimento de eventos adversos locais, por ser relacionado a tratamento tópico local.

Benefícios:

Os benefícios nos dois grupos serão tratados com terapia compressiva, considerado padrão ouro para úlcera venosa proporcionando oportunidade de cicatrização das úlceras de ambos os grupos.

Metodologia de Análise de Dados:

A análise estatística será por intenção de tratar e os dados serão analisados utilizando o software SPSS 20.0. Será considerado significante $p < 0,05$.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é bem escrita e traz detalhamento metodológico e encaminhamentos da pesquisa. Trata-se de um projeto de doutorado do Programa de Pós-graduação em Enfermagem, está orçada em R\$ 7.345,00, contará com financiamento próprio e sua realização possibilitará melhor compreender o controle da infecção superficial em desbridamento cirúrgico superficial associado a curativo de hidrofibra com prata e ação de biofilme quando comparado com o curativo de colagenase em úlceras venosas.

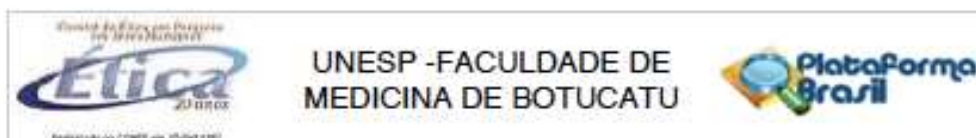
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

A pesquisadora anexou todos os termos obrigatórios exigidos pelo CEP/FMB, isto é, (1) Folha de rosto devidamente assinada; (2) Anuência do EAP; (3) Termo de consentimento livre e esclarecido na forma de convite e em linguagem clara; (4) Autorização e anuência do Chefe do Serviço de Dermatologia da FMB; (5) Autorização do Superintendente do HC/FMB.

Recomendações:

Apresentação dos resultados finais da pesquisa.

Endereço: Chácara Buñgnoli, s/n	CEP: 18.618-970
Bairro: Rubião Junior	
UF: SP	Município: BOTUCATU
Telefone: (14)3880-1809	E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.055.504

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise em reunião ordinária, o Colegiado deliberou APROVADO o projeto de pesquisa apresentado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme deliberação do Colegiado em reunião ordinária do Comitê de Ética em Pesquisa da FMB/UNESP, realizada em 03 de dezembro de 2018, o projeto analisado encontra-se APROVADO, sem necessidade de envio à CONEP.

No entanto, Informamos que ao final da execução da pesquisa, seja enviado o "Relatório Final de Atividades", na forma de "NOTIFICAÇÃO".

Atenciosamente,

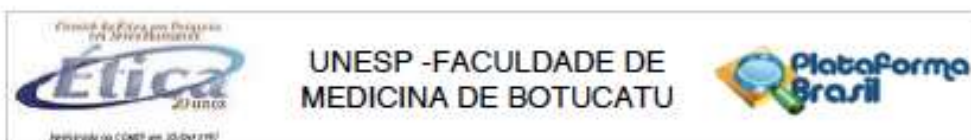
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1239075.pdf	15/10/2018 09:53:43		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDoutoradoTals.docx	15/10/2018 09:53:06	Tals Lopes Saranholl	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	15/10/2018 09:52:43	Tals Lopes Saranholl	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoDeAnuenciainstitucional.pdf	15/10/2018 09:50:49	Tals Lopes Saranholl	Acelto
Folha de Rosto	folhaderostoASS.pdf	15/10/2018 09:50:18	Tals Lopes Saranholl	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacaodermato.pdf	15/10/2018 09:49:54	Tals Lopes Saranholl	Acelto
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoHCFMB.pdf	15/10/2018 09:49:38	Tals Lopes Saranholl	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Chácara Butignolli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1609 E-mail: cep@fmb.unesp.br



Continuação do Parecer: 3.055.504

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOTUCATU, 04 de Dezembro de 2018

Assinado por:
SILVANA ANDREA MOLINA LIMA
 (Coordenador(a))

Endereço: Chácara Butignoli, s/n
 Bairro: Rubião Junior CEP: 18.618-970
 UF: SP Município: BOTUCATU
 Telefone: (14)3880-1609 E-mail: csp@fmb.unesp.br