



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE**

MATHEUS TODT ARAGÃO

**DIFERENÇAS MICROBIOLÓGICAS ENTRE
ÚLCERAS FALCÊMICAS E NÃO FALCÊMICAS**

ARACAJU

2015

MATHEUS TODT ARAGÃO

**DIFERENÇAS MICROBIOLÓGICAS ENTRE
ÚLCERAS FALCÊMICAS E NÃO FALCÊMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. FRANCILENE
AMARAL DA SILVA

Co-orientador: Prof. Dr. MARCO ANTÔNIO
PRADO NUNES

ARACAJU

2015

MATHEUS TODT ARAGÃO

**DIFERENÇAS MICROBIOLÓGICAS ENTRE
ÚLCERAS FALCÊMICAS E NÃO FALCÊMICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. FRANCILENE
AMARAL DA SILVA**

**Examinadora: Prof^a. Dr^a. CRISTINA GAMA
MATOS PEREIRA**

**Examinador: Prof. Dr. WELLINGTON
BARROS DA SILVA**

PARECER

RESUMO

Diferenças Microbiológicas entre Úlceras Falcêmicas e Não Falcêmicas MATHEUS TODT ARAGÃO, ARACAJU, 2015

INTRODUÇÃO: As úlceras em membros inferiores são citadas como a principal manifestação cutânea da anemia falciforme. A infecção das úlceras falcêmicas é frequentemente considerada inevitável, porém seu papel no surgimento e perpetuação das lesões ainda permanece controverso. O presente estudo propõe caracterizar a microbiota da úlcera de membro inferior em pacientes com anemia falciforme e compará-la à microbiota de úlceras de outras etiologia.

MÉTODO: Trata-se de um estudo descritivo e transversal, composto por dois grupos (pacientes com úlcera falcêmica e pacientes com úlceras de outras etiologias), sendo estudadas a microbiota lesional e sua suscetibilidade antimicrobiana. A coleta foi realizada com técnica asséptica, por curetagem, sendo o material analisado por técnica padrão e por método automatizado.

RESULTADOS: Cada grupo foi composto por 19 pacientes, sendo observado nos pacientes com anemia falciforme e úlcera cutânea o predomínio de uma biota unimicrobiana (57,9%), com 31,6% das culturas estéreis, sendo o *Staphylococcus aureus* (31,6%) e a *Pseudomonas aeruginosa* (26,3%) os principais germes isolados. Na avaliação da resistência antimicrobiana, foram observados 2 casos (40%) de *P. aeruginosa* resistentes a aminoglicosídeos, 1 caso (20%) à Ciprofloxacina e 3 casos (60%) à Cefepima, além de 2 casos (33,3%) de *S. aureus* resistentes à Oxacilina e 1 caso (16,7%) à Linezolida. Por outro lado, as úlceras de etiologia não falcêmica demonstraram crescimento bacteriano em 100% dos 19 casos, com maior diversidade microbiológica, sendo isolados predominantemente Gram negativos (89,5%), principalmente *Pseudomonas spp.*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella spp.*. O antibiograma do grupo demonstrou maior resistência, com evidência de resistência à cefalosporinas de quarta geração, carbapenêmicos e aminoglicosídeos. Em comparação, as lesões não falcêmicas demonstraram isolamento bacteriano mais frequente, maior diversidade microbiológica e perfil de resistência antimicrobiana menos favorável que na anemia falciforme. Os resultados do estudo sugerem uma fraca relação entre a microbiota local e o aparecimento e evolução das úlceras falcêmicas.

Palavras-chave: Úlcera da perna; Microbiologia; Anemia Falciforme

ABSTRACT

Microbiological differences between sickle-cell leg ulcers and ulcers of other etiologies

MATHEUS TODT ARAGÃO, ARACAJU, 2015

INTRODUCTION: The ulcers of the lower limbs are cited as the main cutaneous manifestation of sickle-cell anemia. Infection of sickle-cell leg ulcers is often considered inevitable, but its role in the emergence and perpetuation of the injury remains controversial. This study aims to characterize the microbiota of leg ulcers in patients with sickle-cell anemia and compare it to the microbiota of ulcers of other etiologies. **METHODS:** This was a descriptive cross-sectional study, consisting of two groups (patients with sickle-cell leg ulcers and patients with ulcers of other etiologies), where was studied the lesion microbiota and its antimicrobial susceptibility. The material was collected with aseptic technique, by curettage of the ulcer, and was analyzed by standard and automated methods. **RESULTS:** Each group consisted of 19 patients, and was observed in patients with sickle-cell leg ulcer the prevalence of only one bacteria (57.9%), with 31.6% of sterile cultures, and *Staphylococcus aureus* (31.6 %) and *Pseudomonas aeruginosa* (26.3%) were the major microorganisms isolates. In the evaluation of antimicrobial resistance were observed 2 cases (40%) of *P. aeruginosa* resistant to aminoglycosides, 1 case (20%) to Ciprofloxacin and 3 cases (60%) to Cefepime, and 2 cases (33.3%) of *S. aureus* resistant to Oxacillin and 1 case (16.7%) to Linezolid. On ulcers of other etiologies were seen bacterial growth in 100% of the 19 cases, with higher microbial diversity and predominance of Gram-negative (89.5%), especially of *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* and *Proteus mirabilis*. The antibiogram demonstrated greater resistance, with evidence of resistance to fourth generation's cephalosporins, carbapenems and aminoglycosides. In contrast, the lesions not related to sickle-cell disease showed more frequent bacterial isolation, higher microbial diversity and less favorable antimicrobial resistance profile. The study results suggest a weak relationship between the local flora and the evolution of sickle cell ulcers.

Keywords: Leg ulcer; Microbiology; Sickle cell anemia

LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
HU/UFS	Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe
LDH	Desidrogenase Láctica
MeSH	Medical Subject Headings
MIC	Concentração Inibitória Mínima
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
PubMed/Medline	US National Library of Medicine/National Institutes of Health
SCAD/BVS	Serviço Cooperativo de Acesso a Documentos da Biblioteca Virtual em Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	8
2.1 OBJETIVO GERAL	8
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
3 REVISÃO DA LITERATURA	9
3.1 A REVISÃO DA LITERATURA	9
3.2 A ANEMIA FALCIFORME	10
3.3 A ÚLCERA FALCÊMICA	11
3.4 A FISIOPATOLOGIA DA ÚLCERA FALCÊMICA	13
3.5 A INFECÇÃO DAS ÚLCERAS FALCÊMICAS	16
4 MÉTODO	19
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	19
4.2 LOCAL DO ESTUDO	19
4.3 AMOSTRA	19
4.4 COLETA DE DADOS	20
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
4.6 ASPECTOS ÉTICOS	21
5 RESULTADOS	22
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO	33
8 REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

As complicações cutâneas são uma causa frequente de morbidade nos portadores de anemia falciforme, sendo as úlceras de membros inferiores as mais prevalentes (ONYEMACHI, 2011). Estima-se que 8-10% dos portadores da forma homozigótica da falcemia apresentem úlceras em membros inferiores (PALADINO, 2007). Essas úlceras são dolorosas, tendem a ser indolentes, cicatrizando lentamente no curso de meses ou mesmo anos (BALLAS, 2002), sendo a recorrência frequente e respondendo pior ao tratamento do que as úlceras de outras etiologias (PALADINO, 2007). Apesar da baixa mortalidade, as úlceras falcêmicas interferem na qualidade de vida dos pacientes, comprometendo aspectos socioeconômicos (CLARE, 2002).

A fisiopatologia dessas lesões é complexa e suscita diversas dúvidas. Dados sobre sua patogênese e fatores de risco permanecem escassos e frequentemente são contraditórios (HALABI-TAWIL, 2008). Os seguintes fatores são geralmente relacionados à fisiopatogenia das úlceras falcêmicas (MINNITI, 2010; MOHAN, 2000; PALADINO, 2007): obstrução mecânica pelas hemácias afoiçadas, reticulócitos, plaquetas e leucócitos; trombose *in situ*; insuficiência venosa; infecções bacterianas; anormalidade autonômica com vasoconstricção excessiva; anemia (com conseqüente decréscimo do carreamento de O₂); deficiência de antitrombina III; redução na biodisponibilidade e aumento do consumo do óxido nítrico endotelial.

A infecção secundária das úlceras em anemia falciforme é frequentemente considerada inevitável, porém de importância limitada na sua patogenia (AKINYANJU, 1979; CHARACHE, 1981) e raramente produzindo repercussão sistêmica (SERJEANT, 1974). O papel da infecção bacteriana no surgimento e perpetuação das lesões ainda permanece controverso.

A investigação da microbiota lesional da úlcera da anemia falciforme é uma perspectiva de grande potencial, já que pouco se conhece sobre suas características e impacto clínico. Pelo pequeno número de estudos disponíveis, a relação entre infecção local e evolução da úlcera não está bem estabelecida. É de grande importância traçar o perfil microbiológico dessas lesões ulcerosas, já que pode determinar mudanças terapêuticas, além de reforçar orientações preventivas que possam proporcionar uma melhora no seu desfecho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a microbiota da úlcera de membro inferior em pacientes com anemia falciforme e compará-la à microbiota de úlceras de etiologia não falcêmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1 Identificar as espécies bacterianas predominantes nas úlceras falcêmicas.

2.2.2 Identificar as principais espécies bacterianas predominantes em úlceras de etiologia não falcêmica.

2.2.3 Caracterizar a suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas nas úlceras falcêmicas e não falcêmicas

2.2.4 Comparar a microbiota da úlcera falcêmica à biota das úlceras de outras etiologias.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A REVISÃO DA LITERATURA

Para a revisão da literatura, foi consultada a base de dados da PubMed/Medline (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), selecionados termos listados no Medical Subject Heading (MeSH) e operadores Booleanos no intuito de obter uma revisão abrangente, com o seguinte termo de busca utilizado: ("Leg Ulcer/microbiology"[Mesh]) AND ("Anemia, Sickle Cell"[Mesh]). Inicialmente foram selecionadas as publicações que apresentavam os descritores em seu título e(ou) resumo, sendo esses estudos analisados em sua íntegra. As publicações foram obtidas em sua versão integral através do Portal de Periódicos CAPES (www.periodicos.capes.gov.br) e do Serviço Cooperativo de Acesso a Documentos da Biblioteca Virtual em Saúde (SCAD/BVS), acessado através do seu endereço eletrônico (<http://scad.bvs.br/php/index.php>). Foram verificadas ainda as referências dos artigos selecionados, para a obtenção de trabalhos adicionais.

Na revisão da literatura, foram encontrados apenas 7 estudos através do termo de busca utilizado, dos quais apenas 6 deles preenchem os critérios de seleção e sendo todos eles incluídos na revisão. Foram analisadas as referências de todos o estudos selecionados, obtendo-se 5 artigos adicionais, totalizando 11 publicações. Os trabalhos apresentavam metodologia descritiva em sua maioria (8), observando-se ainda 2 revisões narrativas e 1 relato de caso. As publicações foram majoritariamente entre 1974 e 1992, sendo apenas 2 delas nos últimos 15 anos (2002 e 2005), e predominantemente (9) realizadas no continente africano.

Nos estudos revisados (**Apêndice III**), foram descritos 294 casos de pacientes com anemia falciforme e úlcera em membros inferiores, com predominância de homozigotos, sendo o gênero masculino mais frequentemente acometido, com idade variando de 12 a 69 anos, duração da lesão variando amplamente de 15 dias a 19 anos, úlceras majoritariamente unilaterais e com discreta predominância de envolvimento do membro inferior esquerdo. Quanto ao perfil microbiológico, foram observadas culturas geralmente positivas, com

frequências semelhantes de isolamento de um único agente e de uma associação de microorganismos, sendo o *Staphylococcus aureus*, o *Streptococcus pyogenes* e a *Pseudomonas aeruginosa* os agentes mais citados. Foi sugerida a associação fisiopatológica entre infecção local e manutenção das lesões em 5 estudos.

3.2 A ANEMIA FALCIFORME

Aproximadamente 5% da população mundial apresentam genes que codificam hemoglobinopatias, sobretudo a anemia falciforme e a talassemia (WHO, 2011). As hemoglobinopatias representam um problema significativo de saúde em 71% dos 229 países do globo, com cerca de 300.000 crianças acometidas a cada ano, 83% delas por anemia falciforme (WHO, 2011). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), há 20 milhões de pessoas com doença falciforme em todo o planeta. A falcemia é a mais prevalente das hemoglobinopatias, sendo mais comum na África Equatorial, Mediterrânea e Arábia Saudita, podendo chegar a acometer 10-40% da população em algumas regiões. No Brasil, 2-8% da população apresenta a forma heterozigótica da anemia falciforme (o traço falcêmico), sendo estimada uma média de 3.500 nascidos com a doença e 200.000 novos portadores do traço falcêmico por ano (BRASIL, 2014).

As doenças falciformes constituem um grupo de hemoglobinopatias hereditárias que cursam com anemia hemolítica crônica, vasculopatia, fenômenos vasoclusivos e lesões orgânicas. Elas se caracterizam pela presença em homozigose (SS) ou heterozigose (SC) da hemoglobina S, que resulta de uma mutação no sexto códon do gene da betaglobina (cromossomo 11), resultando na substituição do ácido glutâmico pela valina. A hemoglobina S apresenta menor solubilidade no estado desoxigenado, fazendo as moléculas se polimerizarem. O polímero distorce o eritrócito, conferindo um aspecto em foice ou crescente, sendo apenas com a reoxigenação que os polímeros se desfazem e a célula reassume seu formato original. Os diversos ciclos de falcização e desfalcização levam à alterações permanentes da membrana eritrocitária, tornando a célula irreversivelmente deformada, interferindo em sua adesividade

e levando-a a hemólise pelo sistema reticuloendotelial (KATO, 2009; PALADINO, 2007).

O quadro clínico da anemia falciforme é caracterizado por complicações agudas e crônicas. Os eventos agudos são representados pelas crises álgicas, síndrome torácica aguda, acidentes vasculares encefálicos, crises aplásticas, sequestro esplênico e priapismo. As principais complicações crônicas são as úlceras em membros inferiores, a colecistopatia crônica calculosa, a insuficiência renal, a hipertensão pulmonar, o *cor pulmonale*, a necrose isquêmica da cabeça do fêmur, a osteomielite e a retinopatia (ONYEMAECHI, 2011).

3.3 A ÚLCERA FALCÊMICA

As manifestações clínicas da anemia falciforme são diversas, entre elas as úlceras em membros inferiores são relativamente comuns, sendo por vezes citadas como a principal manifestação cutânea (BAZUAYE, 2010). Muitos casos já foram documentados, embora inicialmente muitos deles tenham sido equivocadamente diagnosticados como lesões sífilíticas, sendo Cummer e LaRocco, na primeira metade do século XX, os primeiros a suspeitarem da relação entre anemia falciforme e úlceras de pele e partes moles. A prevalência das úlceras falcêmicas ainda é imprecisa (SERJEANT, 2005), com sua incidência na literatura variando de 8% a 75% (BAZUAYE, 2010). Como essas úlceras geralmente não ameaçam a vida, sua importância permanece subestimada. Entretanto, as lesões apresentam um curso crônico com dor e muitas complicações, sendo responsáveis por importante repercussão na qualidade de vida (HALABI-TAWIL, 2008).

A ocorrência de úlcera em pacientes com anemia falciforme é variável, sendo pouco frequente em menores de 10 anos, geralmente ocorrendo o primeiro episódio entre 10 e 25 anos de idade, e tornando-se infrequente após 30 anos (SERJEANT, 2005). As lesões são mais comuns em pacientes homozigóticos, com uma menor incidência em pacientes que apresentam níveis elevados de hemoglobina fetal (PALADINO, 2007; SERJEANT, 2005). A variação quanto ao sexo permanece incerta, com alguns estudos indicando maior prevalência entre homens (ANKRA-BADU, 1992; BAZUAYE, 2010; KOSHY, 1989; PALADINO, 2007) e outros não relatando variação entre os sexos

(ADEDEJI, 1987). As úlceras ocorrem frequentemente em áreas de tecido adiposo escasso, pele fina e menor suprimento sanguíneo (MINNITI, 2010), acometendo tipicamente as regiões maleolares (SERJEANT, 2005), com alguns autores apontando uma predileção pela porção medial (SERJEANT, 1974), outros pela porção lateral (BAZUAYE, 2010) e outros não relatando diferenças entre os maléolos lateral e medial (KOSHY, 1989).

A maioria das úlceras falcêmicas têm diâmetro menor que 10cm, limites bem definidos, bordas levemente elevadas, com tecido de granulação em sua base, exsudato fibrinoso, sendo compostas por uma única lesão ou por várias lesões pequenas confluentes (SERJEANT, 2005). Uma característica importante da úlcera é a dor, que costuma ser mais intensa que em úlceras de outras etiologias (MINNITI, 2010; PALADINO, 2007; SERJEANT, 2005).

Histologicamente, as úlceras apresentam margens epiteliais atróficas, infiltrado inflamatório e capilares dilatados preenchidos por hemácias afoiçadas. No leito ulceroso, notam-se arteríolas com proliferação evidente da camada íntima, uma camada elástica interna descontínua, infiltrados inflamatórios perivascularares e neovascularização (SERJEANT, 2005).

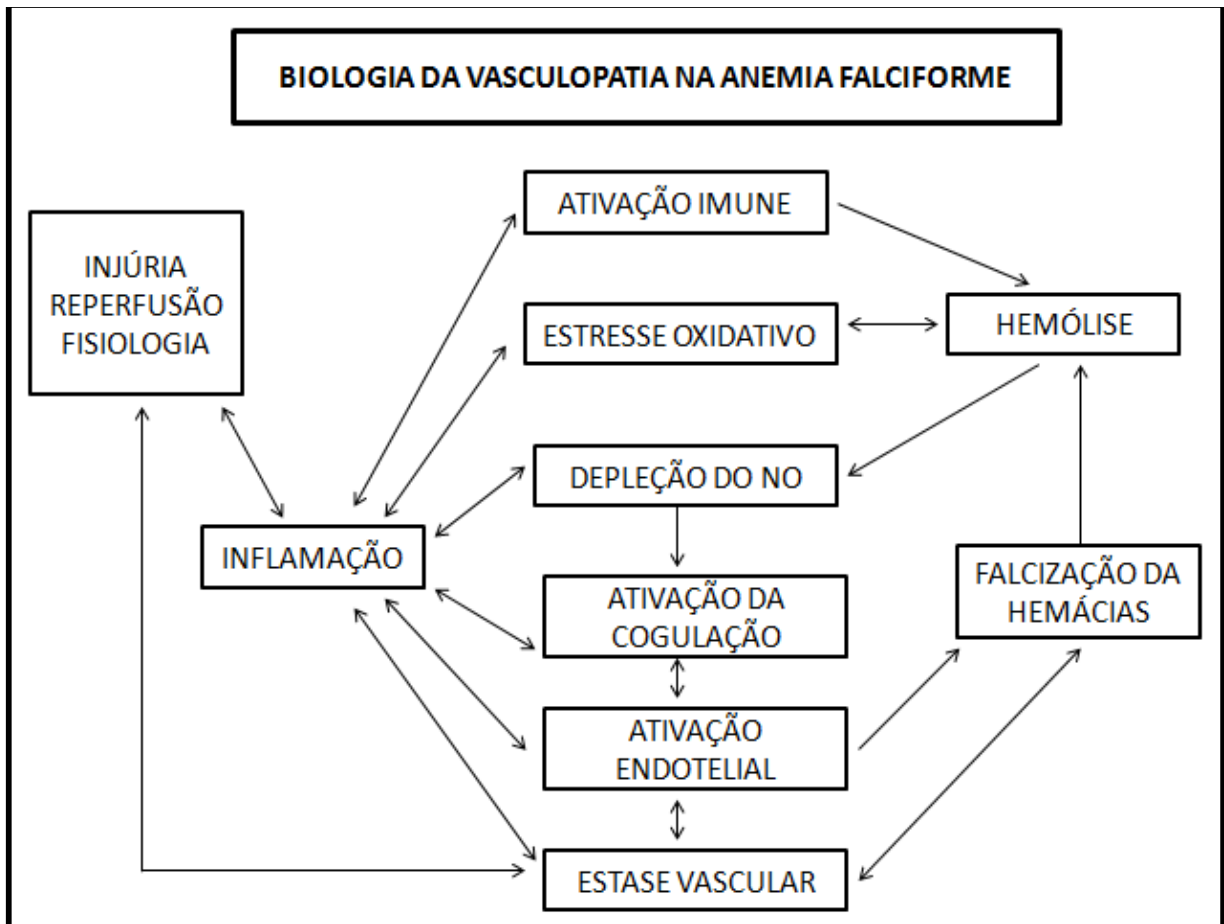
Bazuaye e colaboradores (BAZUAYE, 2010) avaliaram 250 pacientes com anemia falciforme (125 homens e 125 mulheres) e observaram que 58 deles (23,2%) relatavam história de úlcera em membros inferiores, sendo que 24 (9,6%) apresentavam úlcera no momento da investigação. Os autores descreveram que todos os pacientes com úlcera eram homozigotos, que a lesão era mais frequente no sexo masculino (3:1) e que a idade variava entre 18 e 25 anos. Relataram também que o tornozelo esquerdo foi o local mais atingido (66,7%), com lesões de 5-10 cm de diâmetro, início da úlcera associada a trauma na maioria dos casos, tempo de evolução maior que um ano em 50% dos pacientes, recidiva de 75% e infecção secundária em mais de 80%.

O tratamento das úlceras falcêmicas é insatisfatório e os estudos acerca do assunto são escassos (SERJEANT, 2005). As principais medidas terapêuticas incluem educação do paciente, limpeza local, desbridamento, curativos adequados e compressão (LADIZINSKI, 2012; MINNITI, 2010; SERJEANT, 2005). As transfusões sanguíneas, o uso sistêmico de hidroxuréia e zinco, a aplicação de bota de Unna, os desbridamentos cirúrgicos e os enxertos são as modalidades de tratamento mais utilizadas (MINNITI, 2010; SERJEANT,

2005). A antibioticoterapia sistêmica pode ser necessária na evidência de infecção, sendo comum ainda o uso local de anti-sépticos, mas com o papel da terapia antimicrobiana ainda obscuro (LADIZINSKI, 2012; SERJEANT, 2005). No entanto, ainda são poucos os ensaios clínicos controlados comprovando a eficácia dos diferentes tratamentos descritos na literatura (MINNITI, 2010).

3.4 A FISIOPATOLOGIA DA ÚLCERA FALCÊMICA

A fisiopatologia dessas lesões é complexa e suscita diversas dúvidas. Dados sobre sua patogênese e fatores de risco permanecem escassos e frequentemente são contraditórios (HALABI-TAWIL, 2008) Os seguintes fatores são geralmente relacionados à fisiopatogenia das úlceras falcêmicas (MINNITI, 2010; MOHAN, 2000; PALADINO, 2007): obstrução mecânica pelas hemácias afoiçadas, reticulócitos, plaquetas e leucócitos; trombose *in situ*; insuficiência venosa; infecções bacterianas; anormalidade autonômica com vasoconstricção excessiva; anemia (com conseqüente decréscimo do carreamento de O₂); deficiência de antitrombina III; redução na biodisponibilidade e aumento do consumo do óxido nítrico endotelial. Quanto ao início da lesão ulcerosa, metade dos casos está associada ao trauma mecânica enquanto metade surge de forma espontânea (SERJEANT, 2005). Kato e colaboradores (KATO, 2009) propuseram o seguinte fluxograma:



*Óxido Nítrico (NO)

Adaptado de: Kato GJ et al: Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, pathophysiology, genetics, translational medicine and new research directions. *Am. J. Hematol.*, 2009.

O papel da insuficiência venosa na patogenia das úlceras falcêmicas é inconclusivo (PALADINO, 2007). Mohan e colaboradores (MOHAN, 2000) demonstraram, em pacientes homocigotos, a presença de insuficiência venosa nos portadores de úlceras em pernas. Clare e colaboradores (CLARE, 2002) também demonstraram uma relação entre úlceras em membros inferiores e insuficiência venosa, relatando que apenas dois pacientes, entre 78 falcêmicos homocigotos, apresentavam ulceração sem evidência de insuficiência venosa. Já Billett e colaboradores (BILLETT, 1991), demonstraram em 16 pacientes homocigotos portadores de úlcera, que metade não apresentava insuficiência venosa. Chalchal e colaboradores (CHALCHAL, 2001) afirmaram que a insuficiência venosa pode contribuir para o surgimento de úlceras apenas em

uma minoria dos pacientes com anemia falciforme, evidenciando refluxo venoso apenas em poucos pacientes (21%).

A participação da hemólise e dos distúrbios endoteliais na fisiopatologia das úlceras vem sendo questionada. Nolan e colaboradores (NOLAN, 2006) estudaram as características clínico-epidemiológicas das úlceras falcêmicas e a relação destas lesões com a intensidade da hemólise. O estudo envolveu 23 centros norte-americanos, analisados de 1978 a 1998, sendo avaliados 387 pacientes portadores de anemia falciforme com história de úlcera em pernas. Os autores observaram que os pacientes com úlcera apresentavam hemólise mais grave, níveis de reticulócitos, desidrogenase láctica (LDH), bilirrubinas e aspartato aminotransferase (AST) mais elevados que o controle, e índices menores de hemoglobina fetal. O estudo observou que a intensidade da hemólise provavelmente determina a ocorrência da complicação devido à redução da biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), correlacionando as úlceras de perna a outras complicações da falcemia como o acidente vascular encefálico, a hipertensão pulmonar e o priapismo.

Kato (KATO, 2006) e Nolan (NOLAN, 2006) e colaboradores também afirmaram que a ocorrência das úlceras associadas a anemia falciforme possivelmente está associada à intensidade da hemólise (e conseqüentemente, ao consumo de NO) e não à frequência das crises vasclusivas. Contudo, Bunn e colaboradores (BUNN, 2010), em extensa revisão publicada em 2010, questionaram o papel da depleção do NO na fisiopatogenia das complicações da anemia falciforme. Através da comparação de estudos envolvendo pacientes falcêmicos a estudos envolvendo portadores de hemoglobinúria paroxística noturna, os autores salientaram que se o consumo do NO realmente desempenhasse um papel importante nas complicações da anemia falciforme, tais complicações deveriam ser tão ou mais frequentes na hemoglobinúria paroxística, o que não foi observado.

A infecção secundária das úlceras em anemia falciforme é frequentemente considerada inevitável, porém de importância limitada na sua fisiopatologia (AKINYANJU, 1979; CHARACHE, 1981) e raramente produzindo repercussão sistêmica (SERJEANT, 1974). O papel da infecção bacteriana na patogenia das úlceras falcêmicas ainda permanece controverso.

3.5 A INFECÇÃO DAS ÚLCERAS FALCÊMICAS

Os escassos estudos a respeito do tema demonstram resultados contraditórios, com alguns considerando irrelevante o papel da infecção, enquanto outros afirmando que os microorganismos são a causa da cicatrização lenta e da cronicidade das úlceras, havendo discordância inclusive sobre os principais agentes isolados. Se estes microorganismos são colonizantes inofensivos ou responsáveis pela cicatrização retardada, permanece um ponto importante na discussão sobre o papel dos antibióticos no tratamento das úlceras falcêmicas (SERJEANT, 2005).

Akinyanju e Akinsete (AKINYANJU, 1979), em estudo realizado na Nigéria entre 1965 e 1974, acompanharam 834 pacientes com anemia falciforme e, dentre eles, 14 casos de úlcera em membros inferiores. Os pacientes foram avaliados quanto a presença de infecção através de hemocultura e cultura de material das lesões obtido por swab. Apenas uma hemocultura foi positiva, sendo isolado *Staphylococcus aureus*. Quanto as culturas das úlceras, foram isolados: *Staphylococcus aureus* 8 vezes em 5 pacientes, *Pseudomonas spp.* 3 vezes em 3 pacientes, *Streptococcus* beta-hemolítico 2 vezes em 2 pacientes, *Staphylococcus albus*, Coliformes e *Achromobacter spp.* apenas 1 vez em 1 paciente cada. Os autores sugeriram que a infecção desempenha apenas um papel secundário na fisiopatologia das úlceras falcêmicas.

Oluwasanmi e colaboradores (OLUWASANMI, 1980), estudaram 12 pacientes com úlcera e anemia falciforme na Nigéria. Os autores relataram que o *Staphylococcus pyogenes* foi o microorganismo mais frequentemente encontrado nas lesões, sendo isolado também *Salmonella spp.* e *Pseudomonas pyocyaneus* em 1 paciente cada.

MacFarlane, Baum e Serjeant (MACFARLANE, 1986), em estudo realizado entre 1982 e 1983 na Jamaica, obtiveram, através de swab, a cultura de 80 úlceras unilaterais em membros inferiores de pacientes com a forma homozigótica da anemia falciforme, comparando-as a 62 lesões cutâneas superficiais e a 30 úlceras diabéticas. Nas úlceras falcêmicas, foi observado crescimento bacteriano em 78 casos (98%), com microbiota predominantemente aeróbia e polimicrobiana, sendo *Staphylococcus aureus* (51%), *Pseudomonas aeruginosa* (51%) e *Streptococcus* beta-hemolítico (37%) os principais agentes

isolados. Já nas lesões superficiais, foram isolados principalmente *Saphylococcus aureus* (87%), *Streptococcus* beta-hemolítico (72%) e *Pseudomonas spp.* (5%), e nas úlceras diabetogênicas houve um crescimento polimicrobiano de *Streptococcus spp.* (40%), *Pseudomonas spp.* (27%), anaeróbios (27%), *Klesiella spp.* (23%) e *Proteus mirabillis* (20%). Foi observado ainda a presença de *Corynebacterium diphtheriae* em 8 úlceras falcêmicas (10%). Os autores sugeriram que a infecção desempenha um papel importante na fisiopatogenia das úlceras em pacientes com anemia falciforme.

Adedeji e Emokpare (ADEDEJI, 1987), em estudo também conduzido na Nígeria, realizaram a cultura, obtida por swab, de 41 úlceras falcêmicas. Os autores observaram que o isolamento de apenas uma bactéria foi mais frequente (68%), com mais de um microorganismo isolado em 22% e com apenas 10% das lesões sem crescimento bacteriano. O *Saphylococcus aureus* foi encontrado em 26 casos (57%), seguido pela *Escherichia coli* em 8 (17,4%), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp.* e *Proteus spp.* em 3 (6,3%) casos cada, e *Streptococcus* beta-hemolítico em 2 (4,4%) pacientes. O estudo concluiu que a alta incidência de patógenos nas lesões possivelmente desempenha um papel importante na cicatrização lenta dessas úlceras.

Ankra-Badu (ANKRA-BADU, 1992), em estudo realizado em Gana entre 1985 e 1987 com 25 pacientes portadores de úlcera e anemia falciforme, observou, em culturas das lesões, o crescimento de um único microorganismo em 17 casos (68%), crescimento polimicrobiano em 6 (24%) e cultura estéril em 2 (8%). A *Pseudomonas spp.* foi a bactéria mais prevalente, isolada em 11 lesões (34,4%), seguido por *Staphylococcus aureus*, isolado em 6 casos (18,8%), *Proteus spp.* e *Streptococcus* beta-hemolítico, em 5 casos cada (15,6%), e Coliformes em 3 (9,4%).

Ademiluyi e colaboradores (ADEMILUYI, 1988), em estudo conduzido na Nígeria, realizaram avaliação bacteriológico de 26 pacientes com úlcera em membros inferiores e falcemia. As culturas foram feitas através de swab das lesões, sendo encontrada uma flora predominantemente polimicrobiana, com crescimento de anaeróbios em 53,8% dos casos. Os principais microorganismos isolados foram: *Staphylococcus aureus* em 12 casos (46%), *Pseudomonas aeruginosa* em 12 (46%), *Bacteriodes melaninogenicus* em 9 (34,6%), *Escherichia coli* em 8 (30,7%), *Streptococcus pyogenes* em 7 (26,9%) e *Proteus*

mirabilis em 6 (23%). Os autores concluíram que a infecção por bactérias aeróbias e anaeróbias pode estar envolvida na fisiopatogênese das úlceras falcêmicas.

Sehgal e Arunkumar (SEHGAL, 1992) estudaram no Yemen a microbiota obtida por swab de 82 úlceras em pernas de pacientes com anemia falciforme. Foi observado o crescimento de um microorganismo em 29 casos (35%), 2 microorganismos em 35 (43%), 3 microorganismos em 16 (19%) e não foram isolados microorganismos em 2 lesões (2,4%). As bactérias mais frequentemente encontradas foram: *Staphylococcus aureus* em 38 pacientes (46%), *Pseudomonas aeruginosa* em 37 (45%) e *Streptococcus* beta-hemolítico do grupo A em 24 (29%), *Bacterioides melaninogenicus* em 12 (15%) e *Escherichia coli* em 10 (12%). Os autores concluíram que a presença de microorganismos (sobretudo do *Staphylococcus aureus*, da *Pseudomonas aeruginosa* e do *Streptococcus* do grupo A) tem um papel importante na patogenia da úlcera falcêmica.

Quanto a presença de microorganismos incomuns, Baum e colaboradores (BAUM, 1985) relataram o isolamento de *Corynebacterium diphtheriae* em 13 pacientes jamaicanos com úlcera falcêmica. Já Tsakris e colaboradores (TSAKRIS, 2002) relataram um caso de *Pseudomonas luteola* resistente a múltiplos antimicrobianos em um paciente com úlcera em perna e anemia falciforme.

4. MÉTODO

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo descritivo e transversal, no qual, durante 17 meses (julho de 2013 a novembro de 2014), foram coletados dados para preenchimento adequado do protocolo clínico proposto. O estudo foi aprovado e fomentado pelo CNPq (processo 401436/2013-6) e pelo PIBIC (processo PVA1044-21013).

4.2 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado no ambulatório multidisciplinar de cicatrização, instalado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS), situado na Rua Cláudio Batista, S/N, Bairro Santo Antônio, no município de Aracaju (SE).

4.3 AMOSTRA

A amostra foi composta por dois grupos: pacientes com diagnóstico de anemia falciforme e úlcera ativa em membros inferiores e pacientes com úlceras de outras etiologias. Foram contactados os principais serviços que prestam assistência a pacientes portadores de hemoglobinopatias no Estado de Sergipe (serviço de Hematologia do HU/UFS, serviço de Hematologia do Centro de Especialidades Médicas de Aracaju e Centro de Hemoterapia de Sergipe) para a captação de pacientes. Para comparação, foram incluídos pacientes com úlceras ativas em membros inferiores não portadores de hemoglobinopatias, também acompanhados no ambulatório multidisciplinar de cicatrização.

Foram adotados como critérios de inclusão para o grupo com úlcera e anemia falciforme: estar cadastrado e frequentar regularmente o ambulatório multidisciplinar de cicatrização do HU/UFS; ter idade superior a 12 anos; concordar com os termos desta pesquisa; apresentar úlcera em um ou em ambos os membros inferiores; ser portador de anemia falciforme. Foi adotado como critério de exclusão a evasão do ambulatório multidisciplinar de cicatrização.

Quanto ao grupo com úlceras de etiologia não falcêmica, foram adotados os seguintes critérios de inclusão: estar cadastrado e frequentar regularmente o ambulatório multidisciplinar de cicatrização do HU/UFS; ter idade superior a 12

anos; concordar com os termos desta pesquisa; apresentar úlcera em um ou em ambos os membros inferiores; não ser portador de hemoglobinopatias.

4.4 COLETA DE DADOS

O atendimento dos pacientes incluiu anamnese e exame clínico detalhados, além de registro fotográfico e de exames complementares. Os dados clínicos e laboratoriais obtidos foram registrados em instrumento de coleta específico (**Apêndice II**). Dentre as informações registradas incluía: idade, sexo, comorbidades, genótipo da hemoglobinopatia, tempo de evolução da úlcera, número de recidivas, localização das úlceras e cultura de material lesional. Para obtenção de dados adicionais, foram contactados os hematologistas assistentes dos pacientes.

O material foi coletado de forma asséptica das bases das lesões ulcerosas, após limpeza criteriosa com 250mL de solução salina e gazes estéreis, seguindo as orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). O material foi obtido por curetagem realizada por um único profissional, com cureta e lâmina estéreis, na transição das áreas vitalizadas e desvitalizadas, sendo colocado em frasco seco estéril devidamente identificado, e prontamente enviado para o setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas do HU/UFS. Foi optada pela coleta através de curetagem da base da lesão, devido a evidências de amostras superficiais obtidas por swab serem menos fidedignas (MUTLUOGLU, 2012).

As amostras foram cultivadas em meios de cultura Ágar-Sangue, Ágar-Sal-Manitol e Ágar-Eosina-Azul de Metileno (Ágar EMB), a 37°C por 24h. Os microorganismos foram isolados por método padrão baseado na morfologia de suas colônias, aspecto microscópico e coloração de Gram. O material foi, então, submetido à identificação e teste de sensibilidade antimicrobiana automatizados através do MicroScan WalkAway-40 (Siemens).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram armazenados e tabulados usando as ferramentas dos programas Excel 2013 (Microsoft), de propriedade dos pesquisadores. Foi utilizada análise estatística descritiva, sendo calculada a distribuição de freqüências para as variáveis categóricas, e médias, medianas, mínimos e máximos para as variáveis quantitativas. Os resultados foram expressos em termos absolutos, relativos e percentagens, representados através de tabelas. As características dos grupos (idade, sexo, número de lesões e tempo de evolução das lesões), foram comparadas pelo teste Qui-Quadrado (χ^2) e teste T de Student, sendo o critério de significância estatística estabelecido de $p < 0,05$.

4.6 ASPECTOS ÉTICOS

A proposta de trabalho foi apresentada à direção do HU/UFS para autorização da realização da pesquisa. Além disto, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, visando atender às recomendações da resolução nº196/96 e das resoluções complementares do Conselho Nacional de Saúde, sendo aprovado sob o protocolo CAAE nº22037713400005546.

Todo o estudo primou por minimizar os possíveis riscos aos quais os participantes estavam suscetíveis. Foram esclarecidos os termos da pesquisa, sendo informado o direito de desligar-se do estudo a qualquer momento e independentemente do motivo. Foi garantido o sigilo absoluto quanto aos dados coletados e o total acesso do paciente ao seu prontuário. Todos os participantes assinaram e receberam cópia do termo de consentimento livre e esclarecido **(Apêndice I)**.

5 RESULTADOS

No presente estudo, foram incluídos 19 pacientes com história de úlcera em membros inferiores e anemia falciforme, com um total de 40 úlceras avaliadas e uma média de 2,1 úlceras por paciente. Foi observada a distribuição das lesões de forma semelhante entre os sexos (10 homens e 9 mulheres), com idades variando entre 12 e 67 anos (mediana de 33 anos), sendo a grande maioria de portadores da forma homozigótica da anemia falciforme, 17 pacientes (89,5%). Foi notada ausência de outras comorbidades na maioria dos casos (84,2%), com apenas 3 pacientes com história progressiva de insuficiência venosa periférica, não havendo história recente de hospitalização em nenhum caso. O tempo de evolução das lesões ulcerosas variou amplamente, tendo a úlcera mais antiga 34 anos de duração e a mais recente apenas 1 mês (mediana de 1 ano), com uma média de 2,68 recidivas por paciente. Quanto à distribuição entre os membros, foi observada a ocorrência de lesões predominantemente bilaterais (62,5%), 20 delas acometendo cada membro inferior, com as regiões maleolares preferencialmente atingidas, sendo os maléolos mediais envolvidos em 14 pacientes e os laterais em 10.

No grupo dos pacientes com úlcera em membros inferiores e sem hemoglobinopatia, foram estudados 19 pacientes, com um total de 24 úlceras avaliadas e uma média de 1,26 lesões por paciente. Foram observados 8 homens e 11 mulheres, com idade variando de 28 a 92 anos (mediana de 68 anos). A etiologia foi preponderantemente vasculogênica, 12 casos (63,1%), com ocorrência de lesão diabetogênica em 5 (26,3%) e hansênica em 2 (10,5%). O tempo de evolução das lesões ulcerosas variou de 1 a 40 anos (mediada de 8 anos), sendo as lesões predominantemente unilaterais (78,9%), com o membro inferior esquerdo envolvido em 10 casos e o direito em 13.

Tabela I. Características dos pacientes com úlceras falcêmicas e com úlceras de outras etiologias.

Características	Nº Pacientes Com Úlcera e Anemia Falciforme (%)	Nº Pacientes Com Úlcera Sem Anemia Falciforme (%)
Idade (anos)		
11-19	1 (5,3%)	0
20-29	5 (26,3%)	1 (5,3%)
30-39	8 (42,1%)	1 (5,3%)
≥ 40	5 (26,3%)	17 (89,4%)
Sexo		
Masculino	10 (52,6%)	8 (42,1%)
Feminino	9 (47,4%)	11 (57,9%)
Duração da Úlcera		
1 mes - 1 ano	9 (47,4%)	1 (5,3%)
> 1 ano - 5 anos	3 (15,8%)	7 (36,8%)
> 5 anos	7 (36,8%)	11 (57,9%)
Membro Acometido		
Membro inferior direito	14 (73,7%)	13 (68,4%)
Membro inferior esquerdo	13 (68,4%)	10 (52,6%)
Ambos os membros inferiores	8 (42,1%)	4 (21%)
Comorbidades		
Insuficiência vascular	3 (15,8%)	12 (63,1%)
Diabete melito	0	5 (26,3%)

Hanseníase	0	2 (10,5%)
Sem comorbidades	16 (84,2%)	3 (15,8%)

Comparativamente, foi demonstrada homogeneidade entre o grupos estudados quanto ao sexo e ao tempo de evolução das lesões. Já quanto à idade e ao número de úlceras por paciente, foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre o grupos.

Tabela II. Comparação estatística entre características dos grupos: sexo.

	Anemia Falciforme		Total	Valor p
	Sim	Não		
Masculino	10 (53%)	8 (42%)	18	0,637
Feminino	9 (47%)	11 (58%)	20	0,655
Total	19 (100%)	19 (100%)	38	

Tabela III. Comparação estatística entre características dos grupos: idade, número de úlceras e tempo de evolução.

	Anemia Falciforme				Valor p
	Sim		Não		
	Média (DP)	IC _{95%}	Média (DP)	IC _{95%}	
Idade	35,8 (14,2)	(29,0 a 42,7)	64,7 (17,2)	(56,4 a 73,0)	< 0,001
Nº Úlceras	2,1 (1,1)	(1,6 a 2,7)	1,3 (0,6)	(1,0 a 1,5)	0,008
Evolução	5,6 (8,5)	(1,5 a 9,6)	12,6 (12,6)	(6,5 a 18,7)	0,053

Na avaliação da microbiota dos 19 casos, foi notada ausência de crescimento microbiológico em 6 pacientes (31,6%), com isolamento bacteriano em 12 casos (63,1%), sendo 1 amostra perdida. Foi evidenciado o crescimento predominantemente de um único agente etiológico (57,9%), com apenas um caso polimicrobiano. As principais bactérias isoladas foram o *Staphylococcus aureus* (31,6%) e *Pseudomonas aeruginosa* (26,3%), sendo ainda encontrada *Cedecea davisae* em 2 lesões. No único caso de cultura polimicrobiana, foi observada a associação de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela IV. Perfil de resistência antimicrobiana das bactérias isoladas nas úlceras falcêmicas.

Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%)	MIC	<i>Cedecea davisae</i> (%)	MIC	<i>Staphylococcus aureus</i> (%)	MIC
Ampicilina-Sulbactam	-	-	2 (100%)	> 16/8	3 (50%)	8/4 16/8
Amicacina	2 (40%)	≥ 32	0	≤ 16	-	-
Gentamicina	2 (40%)	≥ 8	2 (100%)	≥ 8	-	-
Ciprofloxacina	1 (20%)	> 2	1 (50%)	> 2	2 (33,3%)	2
Clindamicina	-	-	-	-	1 (16,7%)	> 4
Eritromicina	-	-	-	-	3 (50%)	≥ 4
Oxacilina	-	-	-	-	2 (33,3%)	> 2
Cefepima	3 (60%)	≥ 16	1 (50%)	16	-	-
Tigeciclina	-	-	2 (100%)	> 4	-	-
Ertapenem	-	-	1 (50%)	> 4	-	-
Meropenem	0	≤ 1	1 (50%)	8	-	-
Imipenem	0	≤ 1	1 (50%)	8	-	-

Antimicrobiano	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (%)	MIC	<i>Cedecea davisae</i> (%)	MIC	<i>Staphylococcus aureus</i> (%)	MIC
Vancomicina	-	-	-	-	0	1 2
Linezolida	-	-	-	-	1 (16,7%)	> 4
Piperacilina-Tazobactam	5 (100%)	16 ≥ 64	1 (50%)	64	-	-
Total	5		2		6	

*Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Na avaliação da resistência antimicrobiana, evidenciaram-se 2 casos (40%) de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina), 1 caso (20%) resistente à Ciprofloxacina e 3 casos (60%) resistentes à Cefepima. Os *Staphylococcus aureus* isolados apresentaram resistência à Oxacilina em 2 casos (33,3%), à Clindamicina em 1 caso (16,7%), à Eritromicina em 3 casos (50%) e à Linezolida em 1 caso (16,7%).

Tabela V. Bactérias isoladas das úlceras falcêmicas e de outras etiologias.

Microorganismos	Pacientes Com Anemia Falciforme (%)	Pacientes Sem Hemoglobinopatias (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	6 (31,6%)	2 (10,5%)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	0	1 (26,3%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 (26,3%)	5 (26,3%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	1 (5,3%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	1 (5,3%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	1 (5,3%)

Microorganismos	Pacientes Com Anemia Falciforme (%)	Pacientes Sem Hemoglobinopatias (%)
<i>Proteus mirabilis</i>	0	3 (15,8%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0	1 (5,3%)
<i>Escherichia coli</i>	0	1 (5,3%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	1 (5,3%)
<i>Providencia stuartii</i>	0	1 (5,3%)
<i>Morganella morganii</i>	0	1 (5,3%)
<i>Aeromonas hydrophilia</i>	0	1 (5,3%)
<i>Cedecea davisae</i>	2 (10,5%)	0
Sem crescimento	6 (31,6%)	0
Amostra perdida	1 (5,3%)	0

A avaliação microbiológica do grupo sem falcemia demonstrou crescimento bacteriano em todos os 19 casos, sendo encontrado predominantemente 1 único microorganismo (94,7%). Foram isolados principalmente Gram negativos (89,5%), sendo encontrados Gram positivos em 3 pacientes (15,8%). Os principais microrganismos isolados foram *Pseudomonas spp.* (6 casos), *Proteus mirabilis* (3 casos), *Klebsiella spp.* (2 casos) e *Staphylococcus spp.* (3 casos). Na única cultura polimicrobiana foram isolados *Acinetobacter baumannii* e *Aeromonas hydrophilia*. Na avaliação da resistência antimicrobiana, observou-se 1 caso (20%) de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Ciprofloxacina, 2 casos (40%) de resistência a Gentamicina, 1 caso (20%) à Cefepima e 1 caso (20%) à Imipenem. As *Klebsiella spp.* isoladas apresentaram resistência a Gentamicina e Tigeciclina em ambos os casos, sendo uma delas resistente também a Cefepima, Ertapenem e Imepenem. A cepas isoladas de *Proteus mirabilis* demonstraram resistência à

Ciprofloxacina em 1 caso (33%) e à Imipenem em 2 casos (66%). Por fim, todos os *Staphylococcus spp.* isolados apresentaram sensibilidade a Oxacilina.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo evidenciou a predominância das úlceras falcêmicas em adultos jovens, de ambos os sexos, de genótipo homozigótico, sendo as lesões frequentemente múltiplas e bilaterais, sem predileção quanto ao membro inferior acometido, e com evolução com ampla variação mas tendendo a cronicidade. Os achados concordam com a literatura acerca da maior frequência em jovens e homozigotos, e quanto a cronicidade. Porém, os estudos revisados relataram uma maior prevalência no sexo masculino (ADEDEJI, 1987; ADEMILUYI, 1988; AKINYANJU, 1979; ANKRA-BADU, 1992; MACFARLANE, 1986; SEHGAL, 1992), uma ocorrência predominantemente unilateral (ADEDEJI, 1987; ADEMILUYI, 1988; ANKRA-BADU, 1992; MACFARLANE, 1986; OLUWASANMI, 1980; SEHGAL, 1992) e uma discreta predileção pelo membro inferior esquerdo (ADEMILUYI, 1988; ANKRA-BADU, 1992; MACFARLANE, 1986; SEHGAL, 1992).

O estudo realizado confirma algumas características geralmente atribuídas as úlceras de membros inferiores em pacientes falcêmicos. A ocorrência da lesão ulcerosa em portadores da forma homozigótica da hemoglobinopatia é frequentemente relatada, como por Serjeant (SERJEANT, 1974; SEJEANT, 2005) e Paladino (PALADINO, 2007). A faixa etária de maior prevalência também está de acordo com a maioria dos autores, sendo pouco frequente em crianças muito jovens, ocorrendo o primeiro episódio entre 10 e 25 anos (SERJEANT, 2005), de maneira semelhante à observada na amostra. A variação quanto ao sexo permanece incerta, com relatos de uma maior frequência entre homens (ANKRA-BADU, 1992; BAZUAYE, 2010; KOSHY, 1989; PALADINO, 2007) e trabalhos sem evidência de variação significativa entre os sexos (ADEDEJI, 1987), como visto no presente estudo.

Quanto à biota da lesão, foi demonstrada a presença de culturas estéreis em 31,6% dos casos, com isolamento predominantemente de um único microorganismo (57,9%). Os principais agentes encontrados foram o *Staphylococcus aureus* (31,6%) 2 deles (33%) resistentes a Oxacilina, e a *Pseudomonas aeruginosa* (26,3%), resistente a aminoglicosídeos em 2 casos

(40%), à Ciprofloxacina em 1 caso (20%) e à Cefepima em 3 casos (60%). Tais observações demonstram algumas discrepâncias com a literatura revisada. A descrição de culturas estéreis é pouco frequente, variando de 2,5 a 10% dos casos (ADEDEJI, 1987; ANKRA-BADU, 1992; MACFARLANE, 1986; SEHGAL, 1992), um percentual inferior ao encontrado na amostra. As publicações relatam culturas predominantemente positivas, com frequências semelhantes de isolamento uni e polimicrobiano (ADEDEJI, 1987; ANKRA-BADU, 1992; MACFARLANE, 1986; SEHGAL, 1992), contrastando com a biota majoritariamente unimicrobiana observada. O *Staphylococcus aureus*, o *Streptococcus pyogenes* e a *Pseudomonas aeruginosa* foram os agentes mais citados nas literaturas, concordando com o estudo, no entanto, a resistência antimicrobiana frequentemente não foi relatada ou foi descrita de forma superficial impossibilitando uma comparação mais elaborada com os dados obtidos. Não foi notada a presença de anaeróbios, como descrito por Ademiluyi (ADEMILUYI, 1988) e Sehgal (SEHGAL, 1992), nem de *Corynebacterium diphtheriae*, citado por Baum (BAUM, 1985) e Macfarlane (MACFARLANE, 1986), porém foram identificados 2 casos de *Cedecea davisae*, um Gram negativo pouco frequente, configurando o primeiro relato de isolamento do microorganismo em úlceras falcêmicas.

Propõe-se que as diferenças entre o presente estudo e as publicações revisadas possam ser explicadas por características da amostra e por peculiaridades da metodologia utilizada. Os pacientes estudados eram provenientes de acompanhamento ambulatorial, não apresentando história recente de hospitalização ou de uso prolongado de antibióticos, o que certamente interferiu na microbiota. A metodologia mais rigorosa de coleta e processamento do material, possivelmente contribuído para os resultados encontrados. O fato de ter sido utilizada irrigação salina estéril abundante antes da coleta, seguindo as orientações da ANVISA e do NCCLS, optado por curetagem do leito da lesão em detrimento ao swab, como preconizado por Mutluoglu (MUTLUOGLU, 2012), utilizado um único profissional para a obtenção da amostra e o mesmo laboratório para a realização da cultura, proporcionaram dados mais acurados sobre a biota das úlceras falcêmicas.

A avaliação microbiológica do grupo sem falcemia demonstrou crescimento bacteriano em todos os 19 casos, sendo encontrado predominantemente 1 único microorganismo (94,7%) e isolados Gram negativos em 89,5% dos pacientes, principalmente *Pseudomonas spp.*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella spp.* No estudo da resistência antimicrobiana, foi evidenciado 01 caso de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a Ciprofloxacina, Gentamicina, Cefepima e Imipenem, 01 caso de *Klebsiella oxytoca* resistente à Gentamicina, Cefepima, Tigeciclina, Ertapenem e Imipenem, 02 casos de *Proteus mirabilis* resistentes à Imipenem, 01 caso de *Morganella morganii* resistente a Gentamicina, Cefepima e Imipenem, 01 caso de *Aeromonas hydrophilia* resistente à Tigeciclina, Ertapenem e Imipenem, 01 caso de *Escherichia coli* resistente à Cefepima.

Comparativamente, as lesões ulcerosas de etiologia falcêmica e de outras etiologias apresentaram algumas características semelhantes. Em ambos os grupos, houve uma distribuição similar entre os sexos, lesões múltiplas, ausência de predileção quanto ao membro acometido e evolução crônica. No entanto, foi notada uma faixa etária menor e uma maior prevalência de comprometimento bilateral entre os pacientes com anemia falciforme, bem como culturas com isolamento bacteriano mais frequente, maior diversidade microbiológica e perfil de resistência antimicrobiana menos favorável no grupo com úlceras de etiologia não falcêmica.

As úlceras crônicas, em especial as vasculogênicas e diabetogênicas, são temas frequentes na literatura científica. Essas lesões geralmente são infectadas por uma biota polimicrobiana, com predominância de Gram negativos, o que provavelmente contribui no atraso da sua cicatrização (BOWLER, 1998; HONORATO-SAMPAIO, 2014; KIRKETERP-MOLLER, 2011; MALIK, 2013; PARVEZ, 2012; TURAHN, 2013). As bactérias mais frequentes já foram bem documentadas e incluem o *Staphylococcus spp.* e a *Pseudomonas spp.*, embora diversas outras espécies tenham sido relatadas (BOWLER, 2001; HALBERT, 1992). Apesar de haver evidências que a microbiota desempenhe um papel importante na cicatrização, ainda há um debate considerável sobre a importância das espécies colonizantes e infectantes, e da densidade microbiológica na lesão (BOWLER, 2001; HALBERT, 1992; OATES, 2012).

Os resultados obtidos incluem observações importantes sobre a microbiota da úlcera em pacientes com anemia falciforme, contribuindo para a caracterização dessas lesões. Porém, enquanto alguns autores relacionam a biota à fisiopatologia da úlcera (ADEDEJI, 1987; ADEMILUYI, 1988; ANKRABADU, 1992; MACFARLANE, 1986; SEHGAL, 1992), a metodologia do presente estudo não permitiu demonstrar a associação entre a microbiota lesional e o prognóstico da lesão. Salienta-se que a literatura atual não apresenta evidências suficientes para definir o papel da microbiota da lesão na patogênese da úlcera falcêmica, sendo necessárias mais pesquisas nesse intuito. São consideradas como limitações relevantes do estudo, a impossibilidade de pareamento quanto à idade e ao número de lesões por paciente, a metodologia transversal e a amostra, apesar de relevante, reduzida.

Pode ser considerada como implicação prática dos resultados obtidos, o desestímulo ao uso rotineiro de antimicrobianos sistêmicos e(ou) tópicos no tratamento das úlceras falcêmicas. O uso de tais medicamentos deve ser restrito aos casos com evidências indeléveis de infecção, já que os resultados apontam para uma participação apenas secundária da biota local na patogênese dessas lesões ulcerosas.

7 CONCLUSÃO

A microbiota da úlcera de membro inferior em pacientes com anemia falciforme caracterizou-se pelo predomínio de um único microorganismo, principalmente de *Staphylococcus aureus* e de *Pseudomonas aeruginosa*, com a presença importante de culturas estéreis. Em comparação, as lesões não falcêmicas demonstraram isolamento bacteriano mais frequente, maior diversidade microbiológica e perfil de resistência antimicrobiana menos favorável que na anemia falciforme. Os resultados sugerem uma fraca relação entre a microbiota local e o aparecimento e evolução das úlceras falcêmicas, bem como evidenciam a necessidade de mais estudos no intuito de esclarecer o papel da infecção na patogenia da lesão.

8 REFERÊNCIAS

1. Adedeji MO, Emokpare CI. Bacteriology of sickle-cell leg ulcers in the equatorial forest belt of South-Western Nigeria. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1987;90(6):297-300.
2. Ademiluyi SA et al. The anaerobic and aerobic bacterial flora of leg ulcers in patients with sickle-cell disease. *Journal of Infection*. 1988 Sep;17(2):115-20.
3. Akinyanju O, Akinsete I. Leg ulceration in sickle cell disease in Nigeria. *Tropical and Geographical Medicine*. 1979;31:87–91.
4. Ankra-Badu GA. Sickle cell leg ulcers in Ghana. *The East African Medical Journal*. 1992;69(7):366–9.
5. Ballas SK. Treatment of painful sickle cell ulcers with topical opioids. *Blood*. 2002;99:1096.
6. Baum KF et al. *Corynebacterium diphtheriae* in sickle cell leg ulcers in Jamaica. *The West Indian Medical Journal*. 1985;34(1):24-8.
7. Bazuaye GN, Nwannadi AI, Olayemi FE. Leg ulcers in adult sickle cell disease patients in Benin city Nigeria. *Gomal Journal of Medical Sciences*. 2010;8(2):190-4.
8. Billett HH, Patel Y, Rivers SP. Venous insufficiency is not the cause of leg ulcers in sickle cell disease. *The American Journal of Hematology*. 1991;37:133-4.
9. Bowler PG. The anaerobic and aerobic microbiology of wounds: a review. *Wounds*. 1998;10:170-8.
10. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14:244-69.
11. Bunn HF et al. Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. *Blood*. 2010;116(5):687-92.
12. Ministério da Saúde. Portal da Saúde: Anemia Falciforme; 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/955-sas-raiz/dahu-raiz/sangue-e-hemoderivados/l2-sangue-e-hemoderivados/13335-doenca-falciforme>
13. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada a Assistência a Saúde. 1ª ed; 2010.
14. Chalchal H et al. Impaired venous hemodynamics in a minority of patients with chronic leg ulcers due to sickle cell anemia. *Vasa*. 2001;30:277-9.
15. Charache S. Treatment of sickle cell anemia. *Annual Review of Medicine*. 1981;32:195–206.
16. Clare A et al. Chronic leg ulceration in homozygous sickle cell disease: the role of venous incompetence. *British Journal of Haematology*. 2002;119:567-71.
17. Halabi-Tawil M et al. Sickle cell leg ulcers: a frequently disabling complication and a marker of severity. *British Journal of Dermatology*. 2008;158:339-44.

18. Halbert AR et al. The effect of bacterial colonization on venous ulcer healing. *Australasian Journal of Dermatology*. 1992;33:75-80.
19. Honorato-Sampaio K et al. Bacterial biofilm in chronic venous ulcer. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2014;18(3):350-1.
20. Kato GJ et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006;107(6):2279-85.
21. Kato GJ et al. Vasculopathy in sickle cell disease: biology, pathophysiology, genetics, translational medicine and new research directions. *American Journal of Hematology*. 2009;84(9):618-25.
22. Kirketerp-Møller K, Zulkowski K, James G. Chronic wound colonization, infection and biofilms. *Biofilm infections*. 2011:11-24.
23. Koshy M et al. Leg ulcers in patients with sickle cell disease. *Blood*. 1989;74(4):1403-08.
24. Ladizinski B et al. Sickle cell disease and leg ulcers. *Advances in Skin & Wound Care*. 2012;25(9):420-8.
25. Mack AK, Kato GJ. Sickle cell disease and nitric oxide: a paradigm shift. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2006;38(8):1237-43.
26. MacFarlane DE, Baum KF, Serjeant GR. Bacteriology of sickle cell leg ulcers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1986;80(4):553-6.
27. Malik A, Mohammad Z, Ahmad J. The diabetic foot infections: biofilms and antimicrobial resistance. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*. 2013;7:101-7
28. Minniti CP et al. Leg ulcers in sickle cell disease. *The American Journal of Hematology*. 2010;85(10):831-3.
29. Mohan JS et al. Abnormal venous function in patients with homozygous sickle cell (SS) disease and chronic leg ulcers. *Clinical Science*. 2000;98:667-72.
30. Mutluoglu M et al. How reliable are cultures of specimens from superficial swabs compared with those of deep tissue in patients with diabetic foot ulcers? *Journal of Diabetes and Its Complications*. 2012; 26(3) 225-9.
31. Nolan VG et al. Sickle cell leg ulcers: associations with haemolysis and SNPs in Klotho, TEK and genes of the TGF- β BMP pathway. *British Journal of Hematology*. 2006;133(5):570-8.
32. Oates A et al. Molecular and Culture-Based Assessment of the Microbial Diversity of Diabetic Chronic Foot Wounds and Contralateral Skin Sites. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(7) 2263-71.

33. Oluwasanmi JO, Ofodile FA, Akinyemi OO. Leg ulcers in haemoglobinopathies. *The East African Medical Journal*. 1980;57(1):60-4.
34. Onyemaechi NO, Enweani UN, Maduka CO. Musculoskeletal complications of sickle cell disease in Enugu, Nigeria. *Nigerian Journal of Medicine*. 2011;20(4):456-62.
35. Paladino SF. Ulceras de membros inferiores na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*. 2007;29(3):188-90.
36. Parvez N et al. Microbial profile and utility of soft tissue, pus, and bone cultures in diagnosing diabetic foot infections. *Diabetes Technology and Therapeutics*. 2012;14(8):669-74.
37. Sehgal SC, Arunkumar BK. Microbial flora and its significance in pathology of sickle cell disease leg ulcers. *Infection*. 1992;20(2):86-8.
38. Serjeant GR. Leg Ulceration in Sickle Cell Anemia. *Archives of Internal Medicine*. 1974;133:690-4.
39. Serjeant GR et al. Leg Ulceration in Sickle Cell Disease: Medieval Medicine in a Modern World. *Hematology and Oncology Clinics of North America*. 2005;19:943-56.
40. Tsakris A et al. Leg ulcer due to *Pseudomonas luteola* in a patient with sickle cell disease. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2002;42(2):141-3.
41. Turahn V et al. Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2013;(10):707-12.
42. World Health Organization. Sickle-cell disease and other hemoglobin disorders; 2011. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs308/en/>