



UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS PROTOCOLOS DE ASSEPSIA PRÉ-CIRÚRGICA DA
PELE COMO MEDIDA PREVENTIVA DE INFEÇÕES DO LOCAL CIRÚRGICO EM *CANIS*
FAMILIARIS

LUÍS FILIPE MENDES MENDONÇA BELO

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Manuel Chéu Limão Oliveira
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutor Luis Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

2017
LISBOA



CIISA





UNIVERSIDADE DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS PROTOCOLOS DE ASSEPSIA PRÉ-CIRÚRGICA DA
PELE COMO MEDIDA PREVENTIVA DE INFEÇÕES DO LOCAL CIRÚRGICO EM *CANIS*
FAMILIARIS

LUÍS FILIPE MENDES MENDONÇA BELO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Manuel Chéu Limão Oliveira
Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte
Doutor Luis Miguel Alves Carreira

ORIENTADOR

Doutor Luis Miguel Alves Carreira

CO-ORIENTADORA

Doutora Maria Manuela Castilho
Monteiro de Oliveira

2017
LISBOA

*“The Road goes ever on and on
Down from the door where it began.
Now far ahead the Road has gone,
And I must follow, if I can.”*

J. R. R. Tolkien

AGRADECIMENTOS

Não podia deixar de começar por agradecer à minha mãe, que sempre foi uma força da natureza e que me tem guiado tão bem nestes 24 anos da minha vida, nos bons e nos maus momentos. Ao meu pai, pelo exemplo de dedicação quer à família quer à profissão e sem dúvida um exemplo profissional a seguir. À minha irmã, que sendo mais velha, foi a minha proteção e uma prova de que, com esforço e dedicação, conseguimos alcançar as nossas metas. À restante família, que de uma forma ou de outra ajudaram a tornar-me na pessoa que sou hoje, agradeço muito o vosso carinho. Para além da minha família, que foi uma grande força motriz para eu ter chegado a este ponto da minha vida, quero agradecer ao Rui, o maior apoio nesta fase, quem tornou mais agradável e fazível cada época de exames, cada percalço e cada problema. A meu lado, foi também um exemplo de empenho e dedicação, com um percurso exemplar que motiva e dá força ao melhor trio que eu podia ter “RLR”.

A todos os meus amigos que fizeram parte do meu percurso académico e o tornaram cada vez mais agradável, por toda a amizade e brincadeiras. Ao meu maninho Rúben, por todo o companheirismo e amizade neste ano de estágio e tese; será das melhores amizades que levo da FMV. À Filipa Trigo da Roza, por 6 anos de cumplicidade e amizade inigualáveis. À Carolina, por toda a amizade e tudo o que partilhámos até agora, tudo o que me ensinou e tudo o que aprendemos juntos e continuaremos a aprender. Um obrigado especial ao Francisco, à Filipa Prata, à Floriane, à Catarina, à Inês Afonso, à Ana, à Patrícia, à Matilde, à Sara Prata, à Inês Prata e à Inês Machado pela amizade que começou no início do nosso percurso académico e tem perdurado. A todos os meus colegas da melhor turma B e a todos os meus colegas de estágio, o meu obrigado.

Gostava também de agradecer a todo o HEV-FMV, em especial à Dra. Inês e à Dra. Margarida pela amizade e apoio ao longo do meu estágio, foram sem dúvida as pessoas com quem mais aprendi e me diverti. Quero agradecer à Dra. Joana Pontes, Dr. Gonçalo, à Dra. Leonor, ao Dr. Rodrigo, à Enf.^a Carla e à Enf.^a Élia por toda a ajuda e boa disposição no trabalho, por tudo o que me ensinaram e pelos profissionais que são.

Um grande agradecimento ainda aos meus orientadores, Prof. Miguel Carreira e a Prof.^a Manuela Oliveira, duas pessoas extraordinárias com quem muito aprendi e sem os quais isto não teria sido possível. Agradeço ao Prof. Telmo Nunes pela ajuda inigualável em estatística, ao CMVAA pelo apoio ao longo da minha tese, ao CIISA e aos colegas do laboratório de microbiologia e inspeção sanitária, em especial à Dra. Eva e à Dra. Carla. Um especial agradecimento a uma pessoa extraordinária que me guiou ao longo da faculdade, a Prof. Berta, um exemplo de dedicação aos seus alunos.

Por fim, resta-me agradecer ao meu cão e ao meu gato e a todos os animais que de alguma forma me ensinaram algo e me permitiram crescer neste percurso.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS PROTOCOLOS DE ASSEPSIA PRÉ-CIRÚRGICA DA PELE COMO MEDIDA PREVENTIVA DE INFEÇÕES DO LOCAL CIRÚRGICO EM *CANIS FAMILIARIS*

A assepsia pré-cirúrgica da pele é uma das medidas preventivas de infecções do local cirúrgico. A maioria das infecções do local cirúrgico é provocada por agentes comensais e patogênicos provenientes da microbiota do doente. O aumento da disseminação de bactérias resistentes a antibióticos é uma realidade atual. A lâmina de bisturi poderá constituir um fomite de contaminação exógena de bactérias, veiculando-as para o interior do local cirúrgico. Os objetivos do presente estudo foram 1) avaliar a eficácia de dois protocolos de assepsia pré-cirúrgica da pele e 2) avaliar o papel da lâmina de bisturi como fomite de bactérias para os órgãos internos. Utilizou-se uma amostra de 46 canídeos (N=46), escolhidos aleatoriamente e divididos em 2 grupos de acordo com o protocolo de assepsia utilizado: solução aquosa de iodopovidona a 7,5% ou solução alcoólica de clorexidina a 2%. Para cada indivíduo foram recolhidas três amostras em tempos diferentes: pré-assepsia (t0), pós-assepsia (t1) e lâmina de bisturi após incisão da pele (t2). A quantificação e identificação da microbiota utilizou os meios de cultura BHI agar e MRSA agar cromogénico modificado. As espécies de staphylococci foram identificadas recorrendo a API® staph. A distribuição das reduções logarítmicas promovidas por ambos os antissépticos foi muito semelhante, não apresentando diferenças estatisticamente significativas, sugerindo que ambos os protocolos apresentam eficácia semelhante na assepsia e na eliminação de bactérias resistentes à metilina em cirurgia veterinária, especificamente em canídeos.

Palavras-chave: *Cão; Assepsia; Antissépticos; Cirurgia; Clorexidina; Iodopovidona.*

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF TWO PRE-SURGICAL SKIN ASEPSIS PROTOCOLS AS A PREVENTIVE MEASURE OF SURGICAL SITE INFECTIONS IN *CANIS FAMILIARIS*

The skin pre-surgical asepsis is one of the preventive measures of the surgical site infections. Most of these infections are caused by commensal and pathogenic agents from the patient's microbiota. The increase in the dissemination of antibiotic-resistant bacteria is a current topic. The surgical blade could constitute a source of exogenous contamination of bacteria to the interior of the surgical site. The objectives of this study were 1) evaluating the effectiveness of two pre-surgical skin asepsis protocols and 2) evaluate the presence of bacteria in the surgical blade. A sample of 46 dogs (N=46) was studied, which were randomly assigned for an asepsis protocol with aqueous solution of 7,5% povidone-iodine or for a protocol based on an alcoholic solution of 2% chlorhexidine. For each dog, three samples were collected at different times: pre-asepsis (t0), post-asepsis (t1) and surgical blade (t2) after skin incision. For the quantification and identification of the microbiota, were used the BHI agar and the MRSA agar modified chromogenic mediums, respectively. The staphylococci species were identified using API® Staph. The logarithmic reduction promoted by both antiseptics was very similar, not representing statistically significant differences, suggesting that both protocols present similar effectiveness in surgical asepsis and in the elimination of methicillin resistant bacteria in veterinary surgery, specifically in dogs.

Keywords: *Dog; Asepsis; Antiseptics; Surgery; Chlorhexidine; Povidone-iodine.*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	III
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
ÍNDICE	IX
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR	1
NOTA INTRODUTÓRIA	5
PARTE II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
1. MICROBIOTA DA PELE	6
1.1 Função e relação com o hospedeiro.....	6
1.2 Microbiota propriamente dita	7
2. ASSEPSIA CIRÚRGICA	10
2.1 Contextualização histórica.....	10
2.2 Infeção do local cirúrgico.....	11
2.3 Microbiota mais frequentemente isolada em infeções do local cirúrgico	14
2.4 Staphylococci	16
2.5 Medidas de prevenção	19
3. ASSEPSIA PRÉ-CIRÚRGICA DA PELE: AGENTES ANTISSÉPTICOS	22
3.1 Clorexidina	25
3.1.1 Classificação química.....	25
3.1.2 Modo de ação.....	26
3.1.3 Atividade antimicrobiana	28
3.1.4 Aplicações	30
3.2 Iodóforos: Iodopovidona	30
3.2.1 Classificação química.....	31
3.2.2 Modo de ação.....	32
3.2.3 Atividade antimicrobiana	32
3.2.4 Aplicações	33
3.3 Álcoois e agentes à base de Álcool	34
3.3.1 Classificação Química.....	34
3.3.2 Modo de Ação	34
3.3.3 Atividade antimicrobiana	35
3.3.4 Aplicações	36
3.4 Resistência aos Biocidas.....	36

4.	PROTOCOLO DE ASSEPSIA CIRÚRGICA	38
PARTE III – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE DOIS PROTOCOLOS DE ASSEPSIA.....		40
5.	OBJETIVO DO ESTUDO.....	40
6.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
6.1	Amostragem	41
6.2	Protocolo experimental cirúrgico.....	42
6.3	Protocolo experimental laboratorial.....	43
6.4	Análise Estatística	46
7.	RESULTADOS	47
7.1	População em estudo	47
7.2	Quantificação bacteriana em BHI agar	48
7.3	Culturas bacterianas em meio MRSA modificado	51
8.	DISCUSSÃO	54
9.	CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		60
ANEXOS		68
	ANEXO I – CASUÍSTICA DESCRIMINADA NOS SERVIÇOS DE MEDICINA INTERNA, CIRURGIA, IMAGIOLOGIA E MEDICINA PREVENTIVA	68
	ANEXO II – ESQUEMA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL LABORATORIAL (ORIGINAL)	73
	ANEXO III – INDICAÇÕES DO FABRICANTE PARA O MEIO BHI AGAR	75
	ANEXO IV – INDICAÇÕES DO FABRICANTE PARA O MEIO MRSA AGAR CROMOGÉNICO	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia de infeções do local cirúrgico e a sua classificação (adaptado de Horan <i>et al.</i> , 1992).....	11
Figura 2 – Dupla hemólise de <i>S. aureus</i> e <i>S. pseudintermedius</i> em meio agar suplementado com sangue de carneiro (adaptado de Quinn <i>et al.</i> , 2011).....	17
Figura 3 – Molécula de Clorexidina (PubChem CID:9552079).....	26
Figura 4 – Mecanismo de ação antimicrobiana do péptido MAX1, um exemplo de molécula catiónica (adaptado de McCloskey, Gilmore, & Laverty, 2014).....	27
Figura 5 – Molécula de polivinilpirrolidona (PubChem CID:410087).....	31
Figura 6 – Resultados das sementeiras realizadas durante o protocolo experimental laboratorial (original).....	44
Figura 7 – Resultados das sementeiras realizadas durante o protocolo experimental laboratorial (original).....	44
Figura 8 – Sementeira de cocobacilos gram-positivos em meio de Edwards agar (D) e de Slanetz and Bartley agar (E) (original).....	45
Figura 9 – Resultado de uma galeria de identificação bioquímica de um isolado com morfologia de bacilos gram-negativo - API® 20E (F) e de uma galeria de identificação bioquímica de um isolado com morfologia de cocos gram-positivos - API® Staph (G) (original).....	45
Figura 10 – Sementeira em meio BHI agar com quantificação bacteriana incontável (original).....	46
Figura 11 – Aspecto morfológico das culturas correspondentes às sementeiras recolhidas na fase de pré-assepsia, em meio de MRSA agar (original).....	53

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Diferenciação entre <i>S. aureus</i> e <i>S. pseudintermedius</i> (adaptado de Quinn <i>et al.</i> , 2011)	17
Tabela 2 – Mecanismos de ação dos biocidas (adaptado de Chapman, 2003).....	23
Tabela 3 – Agentes antissépticos disponíveis para assepsia pré-cirúrgica da pele (adaptado de Sidhwa & Itani, 2015)	24
Tabela 4 – Atividade bacteriostática da clorexidina contra vários microrganismos (adaptado de Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015)	29
Tabela 5 – Produtos biocidas utilizados e principais características.....	42
Tabela 6 – Características dos canídeos em estudo	47
Tabela 7 – Valores de significância estatística de <i>p value</i>	50
Tabela 8 – Identificação das bactérias isoladas a partir do meio de MRSA modificado	52

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Distribuição do número de horas de estágio despendidas por serviço.....	1
Gráfico 2 – Distribuição da casuística por espécie.....	1
Gráfico 3 – Distribuição percentual das cirurgias assistidas por área.....	2
Gráfico 4 – Distribuição percentual de casos por especialidade	3
Gráfico 5 – Distribuição em <i>boxplot</i> da idade dos animais em estudo.....	41
Gráfico 6 – Distribuição em <i>boxplot</i> do peso dos animais em estudo.....	41
Gráfico 7 – Distribuição da amostra por tipo de cirurgia, por agente	47
Gráfico 8 – Redução logarítmica da quantificação bacteriana para a iodopovidona (B) e clorexidina (C).....	48
Gráfico 9 – Histograma da redução logarítmica de UFC/mL para Iodopovidona (B)	49
Gráfico 10 – Histograma da redução logarítmica de UFC/mL para Clorexidina (C).....	49
Gráfico 11 – Gráfico de <i>densityPlot</i> correspondendo à distribuição da redução logarítmica para os grupos de estudo iodopovidona (B) e clorexidina (C)	49
Gráfico 12 – Gráfico de <i>Boxplot</i> com evidenciação dos quatro valores <i>outliers</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – ácido desoxirribonucleico

API – Índice Analítico de Perfil (*Analytical Profile Index*)

ARN – ácido ribonucleico

BHI – meio de cultura de crescimento inespecífico (*Brain Heart Infusion*)

CDC – Centro para Controlo e Prevenção de Doenças (*Centers of Disease Control and Prevention*)

CMI – Concentração Mínima Inibitória

COS – meio de columbia agar sangue suplementado com 5% sangue carneiro

CMVAA – Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis

FDA – Administração de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*)

HEV – FMV – Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

GABA – aminoácido gama-butírico

LPS – lipopolissacáridos

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (*Methicilin resistant Staphylococcus aureus*)

MRSE – *Staphylococcus epidermidis* resistente à meticilina (*Methicilin resistant Staphylococcus epidermidis*)

MRSP – *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (*Methicilin resistant Staphylococcus pseudintermedius*)

MSSA – *Staphylococcus aureus* susceptível à meticilina (*Methicilin susceptible Staphylococcus aureus*)

NNIS – sistema Nacional de Vigilância de Infecções Nosocomiais (*National Nosocomial Infections Surveillance*)

rARN – ácido ribonucleico ribossomal

OMS – Organização Mundial de Saúde

SNC – Sistema Nervoso Central

TC – Tomografia computadorizada

UFC – Unidade Formadora de Colónias

UIC – Unidade de doenças infeto-contagiosas

VRE – Enterococci resistentes à vancomicina (*vancomycin-resistant Enterococci*)

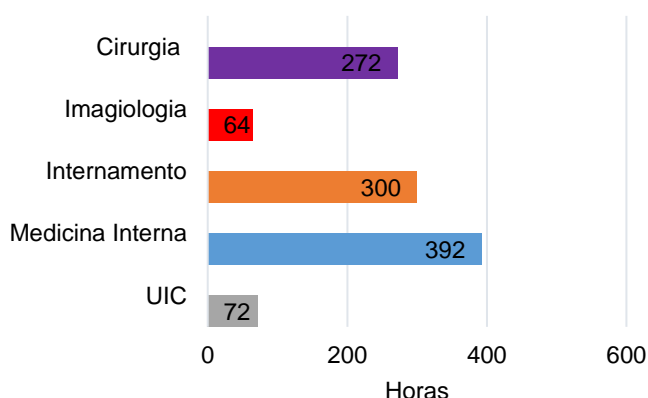
VSE – Enterococci susceptíveis à vancomicina (*vancomycin-susceptible Enterococci*)

PARTE I – RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR

O estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária (MIMV) foi realizado no Hospital Escolar Veterinário (HEV) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, no período compreendido entre setembro de 2016 e março de 2017, perfazendo um total de 1100 horas investidas, excluindo todas as horas extraordinárias despendidas voluntariamente.

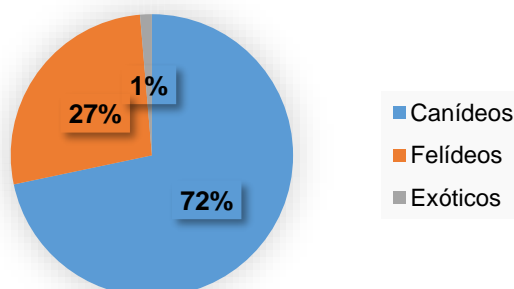
As horas realizadas nos seis meses de estágio foram distribuídas de acordo com um sistema de rotatividade de horários, semanais ou mensais, dentro da clínica de animais de companhia e exóticos, incluindo os serviços de Medicina Interna, Imagiologia, Cirurgia e a unidade de Doenças Infeto-contagiosas (UIC). No Gráfico 1 consta a distribuição de horas despendidas em cada serviço, estando a casuística discriminada no Anexo I. Todas as atividades desenvolvidas foram acompanhadas e supervisionadas pelo corpo clínico do hospital, incluindo médicos, enfermeiros e auxiliares e alguns professores.

Gráfico 1 – Distribuição do número de horas de estágio despendidas por serviço



A casuística observada englobou canídeos, felídeos e alguns exóticos, tais como coelhos, ratazanas, aves e répteis, encontrando-se a distribuição percentual de casos especificada no Gráfico 2.

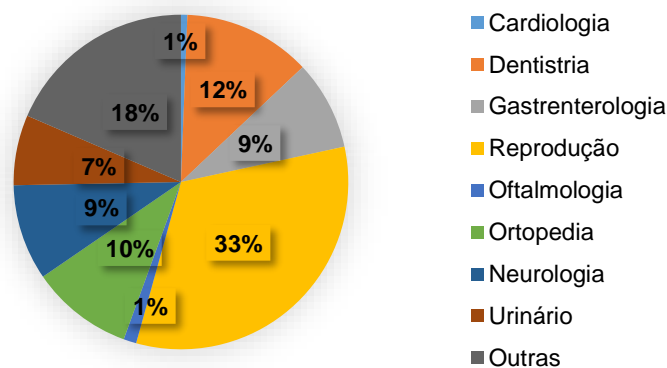
Gráfico 2 – Distribuição da casuística por espécie



No serviço de cirurgia participei nas seguintes atividades: admissão dos animais e avaliação dos requisitos pré-cirúrgicos de forma a garantir um estado pré-anestésico adequado; preenchimento da ficha de internamento de cada animal; cateterização venosa e início de fluidoterapia; preparação e administração dos fármacos, intubação endotraqueal, monitorização anestésica, tricotomia do local cirúrgico e respetiva assepsia. No bloco cirúrgico foi possível participar alternadamente nas tarefas de cirurgião, de ajudante de cirurgião, de anestesista e de circulante. Terminando a cirurgia, acompanhava o doente no recobro e no internamento até o médico internista se responsabilizar pelo mesmo, participando ainda na comunicação aos tutores do término da cirurgia, o agendamento da nota de alta e discussão do plano terapêutico pós-cirúrgico.

Neste serviço, acompanhei as cirurgias de todos os cirurgiões do HEV, tendo dado primazia às cirurgias do meu orientador, Prof. Doutor Miguel Carreira nos dias em que este se encontrava no hospital. Foi-me permitido participar em diversas cirurgias de múltiplas áreas, como representado no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Distribuição percentual das cirurgias assistidas por área



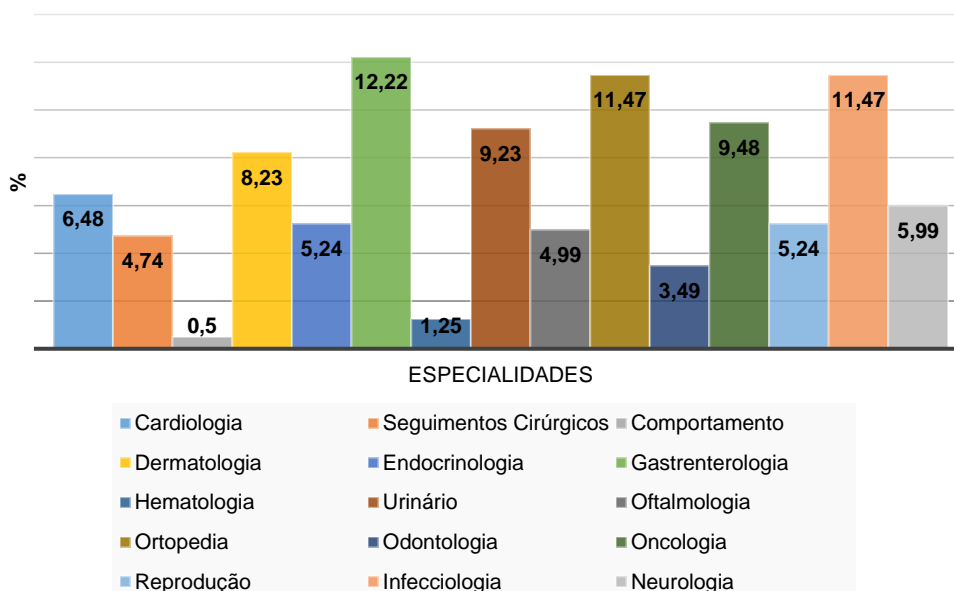
O serviço de imagiologia do HEV proporciona o acesso às técnicas de diagnóstico de radiografia, de tomografia computadorizada (TC) e de ecografia. No decorrer da minha passagem por este serviço, tive a oportunidade de desempenhar funções nas três valências. Na realização de radiografias, participei no posicionamento dos animais, escolha da janela de incidência, disparo do raio X e interpretação e discussão das imagens obtidas. Na realização de TC participei na sedação e anestesia dos doentes, posicionamento, recobro e interpretação e discussão das imagens obtidas. Contudo, foi na ecografia onde despendi mais horas de treino devido ao meu interesse pessoal, especialmente por ecocardiografias. Tive a oportunidade de observar e realizar ecografias transabdominais e ecocardiografias, acompanhando alguns casos clínicos e reavaliações ecográficas.

No serviço de internamento, no início de cada turno, é feita a passagem de casos clínicos da equipa responsável para a nova equipa, incluindo médicos, enfermeiros e auxiliares e o

estagiário atribuído ao internamento. Neste serviço, os turnos realizados foram de 12 horas, no período da manhã ou da noite. Enquanto estagiário, realizei as monitorizações dos animais internados, preparação da medicação e sua administração, instalação e controlo de taxas de fluidoterapia, realização de colheita de amostras biológicas e higienização das instalações. Na medicina interna foi onde consegui desenvolver mais as capacidades de raciocínio, de discussão de diagnósticos diferenciais, de organização e de comunicação. Neste serviço, acompanhei consultas de medicina interna, medicina preventiva e de especialidades, tais como animais exóticos, cardiologia, comportamento animal, dermatologia, endocrinologia, gastrenterologia, neurologia, odontologia, oftalmologia, oncologia, ortopedia, traumatologia, cirurgia e reprodução.

A distribuição percentual de casos por especialidade encontra-se representada no Gráfico 4. No início da consulta recolhia e registava a história pregressa e o estímulo iatrotrópico e realizava o exame objetivo do doente. Recolhida toda a informação pertinente, sinais e sintomas, era discutido com o clínico responsável a lista dos diagnósticos diferenciais, exames complementares a propor e planos de diagnóstico e terapêutica. Foi ainda possível proceder à recolha de amostras biológicas e à preparação e administração de fármacos durante a consulta.

Gráfico 4 – Distribuição percentual de casos por especialidade



Por fim, na UIC as competências desenvolvidas foram semelhantes às adquiridas no serviço de internamento, com a salvaguarda de se tratarem de animais com suspeita ou diagnóstico confirmado de doença infetocontagiosa. Neste serviço, os cuidados de segurança pessoal são acrescidos e todas as monitorizações e contactos com os animais são feitos obrigatoriamente com equipamentos de proteção individual.

Em suma, o estágio no HEV-FMV permitiu-me desenvolver competências em diversas áreas e observar casos clínicos bastante complexos dentro das várias especialidades. Findos os seis meses de estágio, tenho agora uma visão e perspetiva mais realísticas do trabalho a realizar a nível hospitalar, e das valências de um médico veterinário e de uma equipa hospitalar.

Durante o mesmo período, desenvolvi o meu projeto conducente à dissertação de mestrado, o qual teve lugar no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-ULisboa, onde me foi possível melhorar as competências de segurança e higiene no trabalho, bem como aprender a realizar diversos procedimentos laboratoriais. No laboratório, processei as amostras para a realização do meu projeto, recolhidas durante o período de estágio no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis (CMVAA), e participei nas várias etapas do processo laboratorial, desde a produção dos meios de cultura inespecíficos, específicos e cromogénicos, à interpretação e identificação de bactérias pela utilização de técnicas de coloração, técnicas bioquímicas e realização de galerias bioquímicas de identificação (API®).

NOTA INTRODUTÓRIA

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as infeções do local cirúrgico são o tipo de infeções associadas aos cuidados médicos mais frequente em países em desenvolvimento, afetando até um terço dos doentes submetidos a cirurgia, e o segundo tipo mais frequente na Europa e Estados Unidos da América (World Health Organization, 2016). Em todas as etapas pré, intra e pós-cirúrgicas existem fatores de risco para o desenvolvimento de infeções do local cirúrgico, sendo que a prevenção deste tipo de infeções é difícil e requer a integração de diversas medidas preventivas realizadas antes, durante e após a cirurgia. No entanto, a implementação de tais medidas não está preconizada a nível mundial, não existindo até ao momento de início de desenvolvimento deste estudo diretivas internacionais e havendo uma falta de consistência entre diretivas nacionais de país para país. Assim, em 2016, a OMS desenvolveu as diretivas para a prevenção de infeções do local cirúrgico em medicina humana, com o intuito de protocolar internacionalmente medidas preventivas pré, intra e pós-cirúrgicas (World Health Organization, 2016).

Em relação ao agente antisséptico utilizado nestes protocolos, vários estudos comparativos têm sido realizados para avaliação de soluções à base de clorexidina e à base de iodopovidona, quer em medicina humana quer em medicina veterinária (Renberg, 2011). E, apesar de, em medicina humana, a OMS recomendar o uso de soluções alcoólicas à base de gluconato de clorexidina para a assepsia de pele de pacientes submetidos a cirurgia (World Health Organization, 2016) e o Centro para o Controlo e Prevenção de Doenças recomendar o uso de soluções alcoólicas (Berríos-Torres *et al.*, 2017), em medicina veterinária ainda não foi possível demonstrar qual destes biocidas apresenta maior eficácia na redução da microbiota da pele e, conseqüentemente, das infeções do local cirúrgico (Renberg, 2011).

Está assim aberta a base para o meu trabalho de investigação, cujo objetivo foi comparar a eficácia de dois protocolos de assepsia pré-cirúrgica, um com um produto à base de clorexidina e outro com um produto à base iodopovidona, como medida preventiva de infeções do local cirúrgico.

Para além disso, sabendo que os principais agentes isolados de infeções do local cirúrgico em cães são staphylococci, devido à sua natureza comensal e oportunista (Verwilghen & Singh, 2015), e tendo-se verificado um aumento no número de infeções por microrganismos patogénicos resistentes a antibióticos em medicina veterinária, justifica um segundo objetivo, o de averiguar a presença de staphylococci resistentes a antibióticos na pele de canídeos, bem como a eficácia dos principais biocidas na sua eliminação.

Por fim, pretendeu-se ainda investigar a presença de bactérias na lâmina de bisturi após assepsia do campo cirúrgico, podendo tal constituir um fator de risco para infeções do local cirúrgico.

1. MICROBIOTA DA PELE

1.1 Função e relação com o hospedeiro

A pele constitui uma barreira física protetora para o animal, necessária para a sua sobrevivência. Esta barreira é constituída por quatro componentes: comportamental, física, química e microbiológica. A componente comportamental inclui resposta de evicção, que permite ao animal reduzir a ocorrência de traumatismos da pele, e a lambedura, que contribui para a redução de parasitas, limpeza da pele e pelo e distribuição de secreções cutâneas. A componente física é constituída por pelos (a primeira linha de defesa física), que previnem o contacto com agentes patogénicos e minimizam a exposição da pele a agressões físicas e químicas, e ainda pelo estrato córneo, que é um conjunto de células queratinizadas numa emulsão sebácea que contém lípidos epidermais. Para além de contribuir para a proteção física, esta emulsão é também uma barreira química, uma vez que contém substâncias solúveis em água, como sais inorgânicos e proteínas, que podem apresentar ação inibitória contra os microrganismos. Os ácidos gordos presentes nesta emulsão, especialmente o ácido linoleico, apresentam propriedades antibacterianas. São, ainda, de particular interesse os péptidos antimicrobianos secretados pelas células epidermais, como as defensinas, catelicidina e adrenomedulina, produzidos em resposta à atividade bacteriana. Para além disso, algumas bactérias, como *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp., são capazes de produzir substâncias antimicrobianas e outras são capazes de produzir enzimas, como β -lactamases, que inibem certos antibióticos (Miller, Griffin, & Campbell, 2013a, 2013b). A pele, sendo uma barreira física entre o indivíduo e o ambiente exterior, está em contacto com milhares de microrganismos interagindo com eles de modo a manter o equilíbrio. A microbiota comensal da pele pode variar consoante o ambiente cutâneo envolvente, sendo afetada por fatores como o calor, o pH, a salinidade, a humidade, os níveis de albumina séricos e os níveis de ácidos gordos (Miller *et al.*, 2013a). As bactérias são os microrganismos mais abundantes presentes na superfície da pele, embora a microbiota cutânea também possa incluir alguns fungos e leveduras. A microbiota comensal da pele constitui também uma barreira protetora, uma vez que a relação estreita que se estabelece entre o hospedeiro e os microrganismos permite a criação de microambientes e a inibição da colonização por microrganismos invasores (Miller *et al.*, 2013a, 2013b). Os microrganismos da pele estabelecem entre si vários tipos de interações, incluindo de antagonismo recíproco, no qual a multiplicação de um organismo e os produtos derivados do seu metabolismo são desfavoráveis a outro, e de sinergismo, no qual os produtos metabólicos e condições ambientais derivadas da multiplicação de um microrganismo favorecem outros. Este tipo de interação ocorre frequentemente em lesões cutâneas, quando há multiplicação das

populações de *Staphylococcus pseudintermedius* paralelamente a *Malassezia pachydermatis*. Por fim, os microrganismos cutâneos podem ainda estabelecer associações neutras (Cuscó, Sánchez, Altet, Ferrer, & Francino, 2017).

A microbiota comensal da pele é essencial para o ótimo funcionamento desta, que é o maior órgão do corpo, modulando a resposta imune inata e prevenindo a colonização por outros microrganismos potencialmente patogênicos. Em diversas doenças dermatológicas, permanece ainda pouco claro se as alterações cutâneas são provocadas pela alteração no microbioma cutâneo ou se vice-versa (Hoffmann *et al.*, 2014).

Atualmente, sabe-se que, quer no homem quer nos animais, uma grande variedade de fatores associados ao indivíduo como a idade avançada, uma infecção concomitante, colonização por *Staphylococcus aureus* e/ou outros agentes patogênicos, diabetes mellitus, hiperadrenocorticismismo, anemia, parasitismo, inalação de fumo, doença cardíaca, doença pulmonar crônica, choque, insuficiência renal, cirrose hepática, corticoterapia sistêmica, obesidade (>20% do peso corporal ideal) ou mesmo a subnutrição com deficiência em proteínas desregulam a sua microbiota e sistema imunitário, aumentando a probabilidade de este contrair uma infecção do local cirúrgico, a qual se pode desenvolver não só por contaminação do local cirúrgico com microrganismos potencialmente patogênicos, mas também a partir de microrganismos comensais (Dominioni, Imperatori, Rotolo, & Rovera, 2006; Mangram, Horan, Pearson, Silver, & Jarvis, 1999; Nelson, 2011; Owens & Stoessel, 2008).

1.2 Microbiota propriamente dita

As bactérias que compõem a microbiota normal da pele são classificadas como comensais ou transientes, dependendo se têm ou não a capacidade de se multiplicar na pele, respetivamente. O número de microrganismos presentes varia de região anatômica para região anatômica, sendo as zonas húmidas, como queixo, espaço interdigital e virilhas, as mais colonizadas (Miller *et al.*, 2013a). Nos canídeos, os principais microrganismos comensais da pele, e portanto, com capacidade para se multiplicarem na sua superfície, são: *Micrococcus* spp., staphylococci, especialmente *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus xylosum*, streptococci α -hemolíticos, *Clostridium* spp., *Propionibacterium acnes*, *Acinetobacter* spp. e vários aeróbios gram-negativos. Os pelos e folículos pilosos apresentam a sua própria microbiota. Nos pelos encontram-se *Micrococcus* spp., aeróbios gram-negativos, *Bacillus* spp. e *Staphylococcus pseudintermedius*, sendo que staphylococci se encontram mais distalmente, enquanto que os aeróbios gram-negativos se encontram mais proximalmente. Já nos folículos é possível encontrar: *Micrococcus* spp., *P. acnes*, streptococci, *Bacillus* spp. e *S. pseudintermedius* (Miller *et al.*, 2013a).

S. pseudintermedius encontra-se frequentemente presente em diversas regiões anatômicas de animais saudáveis, como as narinas, a orofaringe e o esfíncter anal, sendo considerado um dos agentes comensais da microbiota destas regiões anatômicas. Este microrganismo pode disseminar-se a partir destas zonas para o resto da pele, pelo que pertence à microbiota transiente da superfície da pele. Quanto aos staphylococci cutâneos comensais, estes são adquiridos pós-parto no período neonatal, incluindo as estirpes dominantes de *S. pseudintermedius* que persistem durante toda a vida do cão (Miller *et al.*, 2013a).

No que respeita aos organismos da microbiota transiente, isolados que colonizam os estratos superficiais da pele não apresentam significado clínico, a não ser que estejam envolvidos em processos infecciosos atuando como invasores secundários. Não se multiplicam na pele de animais saudáveis e são por isso facilmente removidos pelas técnicas de rotina de limpeza das mãos (World Health Organization, 2016). Em cães, a microbiota transiente é composta por *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e staphylococci coagulase positivos. É também possível encontrar *S. pseudintermedius* coagulase positivo como o agente patogénico primário cutâneo do cão, indentificando-se diversas estirpes diferentes. As estirpes pertencentes a esta espécie têm a capacidade de produzir uma variedade de fatores de virulência como enterotoxinas (A, B, C e D), toxina do choque tóxico, toxina exfoliativa, leucotoxinas, proteína A e hemolisinas. Estas toxinas, e em especial a A e a C, promovem a adesão das bactérias, impedindo a sua fagocitose e atuando ainda como superantígenos que corrompem facilmente a resposta imunitária (Miller *et al.*, 2013a).

A quantidade de bactérias comensais na pele tende a variar de indivíduo para indivíduo. No entanto, o número de microrganismos por indivíduo deve permanecer constante, exceto quando se institui terapêutica antimicrobiana ou se ocorrerem alterações no ambiente cutâneo. As populações microbianas tendem a aumentar em ambientes quentes e húmidos, sendo o principal impulsionador o fator humidade (Miller *et al.*, 2013a).

De acordo com Cuscó *et al.* (2017), os principais filos bacterianos que se encontram na pele de humanos são Actinobacteria, Bacteroidetes e Proteobacteria. Em humanos, a pele apresenta diferentes microhabitats caracterizados pela predominância de um determinado taxa. Nas regiões sebáceas predominam *Propionibacterium* spp.; nas regiões húmidas predominam *Staphylococcus* e *Corynebacterium* spp.; e nas regiões secas predominam microrganismos gram-negativos. Na pele de cães verifica-se a presença dos mesmos filos, acrescentando-se ainda Fusobacteria como um dos principais filos presentes nas extremidades (mãos e pés), fronte e virilhas. Porém, apesar de ser possível observar diferenças na composição da microbiota nestas regiões anatômicas no cão, ainda não foi possível relacionar esta variação com a presença de microhabitats diferentes. Verifica-se que

a maior diversidade de espécies está presente no canal auditivo interno, enquanto a menor diversidade se encontra na região perineal (Cuscó *et al.*, 2017).

Hoffmann *et al.* (2014), através da técnica de sequenciação da região 16S ribossomal do ácido ribonucleico (rARN) dos genomas bacterianos que compõem a microbiota cutânea do cão, concluíram que a pele destes é habitada por um conjunto de microrganismos muito mais vasto e diversificado do que se isolava através dos métodos de cultura convencionais. Esta técnica revelou a ocorrência de uma grande variabilidade individual entre amostras de diferentes indivíduos, tendo sido possível identificar 17 filos em amostras de pele e mucosas de diversas regiões anatómicas, onde o filo Proteobacteria foi o mais frequente, seguido de Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria. Nas zonas anatómicas mais húmidas os filos mais frequentemente isolados foram Proteobacteria, seguido do filo Bacteroidetes e depois Actinobacteria. Já nas amostras da região perianal, ao filo Proteobacteria seguiram-se os filos Firmicutes, Bacteroidetes, Fusobacteria e só depois Actinobacteria (Hoffmann *et al.*, 2014).

A família *Oxalobacteriaceae* (phylum Proteobacteria; classe Betaproteobacteria; ordem Burkholderiales) foi o grupo mais frequentemente isolado. O género *Ralstonia* spp. foi o mais identificado, correspondendo a um intervalo entre os 5% do total de taxa identificados na comissura labial aos 35% do total de taxa identificados na conjuntiva (Hoffmann *et al.*, 2014). Assim, ao nível do pavilhão auricular, conjuntiva, região dorso-lombar, ouvido e virilha a classe mais identificada foi a Betaproteobacteria; nas regiões axilar e interdigital a classe Actinobacteria; na comissura labial e narinas a classe Gammaproteobacteria; na face dorsal do nariz a classe Alphaproteobacteria; na região periocular a classe Bacilli; e na região perianal as classes Clostridia e Bacteroidia (Hoffmann *et al.*, 2014).

A família *Moraxellaceae*, foi significativamente mais abundante nas narinas comparando com outras regiões anatómicas. A comissura labial foi predominantemente colonizada pela família *Porphyromonadaceae*, género *Porphyromonas* spp. Outros géneros frequentemente encontrados na maioria das amostras de pele e junções mucocutâneas incluem *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Macrococcus* spp. e *Pseudomonas* spp (Hoffmann *et al.*, 2014).

Meason-Smith *et al.* (2015), avaliaram as espécies de fungos mais predominantes na pele do cão, concluindo que Ascomycota era o filo predominante, tendo sido possível isolar fungos pertencentes à classe Dothideomycetes e aos géneros *Alternaria*, *Cladosporium* e *Epicoccum*. Seguiu-se o filo Basidiomycota, que incluía isolados pertencentes ao géneros *Cryptococcus* e *Malassezia* (Meason-Smith *et al.*, 2015).

Esta distribuição varia em cães com doenças de pele alérgicas. De acordo com um estudo de Hoffmann *et al.* (2014), os cães com atopia apresentam uma maior diversidade de espécies bacterianas nas mesmas regiões anatómicas, em comparação com animais saudáveis. No entanto, as bactérias pertencem aos mesmos grupos taxonómicos identificados em cães saudáveis. Também os grupos taxonómicos que apresentam baixa representação em cães

saudáveis estão, frequentemente, ausentes na pele de cães alérgicos. Uma grande diferença encontrada entre saudáveis e alérgicos é a proporção da Betaproteobacteria *Ralstonia* spp., que se verificou bastante reduzida em cães alérgicos (Hoffmann *et al.*, 2014).

Assim, uma vez que a maioria das infecções dos locais cirúrgicos são provocadas por microrganismos da microbiota comensal do doente, é importante realizar e garantir uma boa assepsia da pele pré-cirurgicamente, como uma das medidas preventivas do estabelecimento de infecção (Mangram *et al.*, 1999; Owens & Stoessel, 2008).

2. ASSEPSIA CIRÚRGICA

2.1 Contextualização histórica

Até meados do século XIX, os doentes cirúrgicos desenvolviam frequentemente “febres irritativas”, seguidas da ocorrência de corrimento purulento a partir das incisões, culminando em sépsis e, muitas vezes, na morte do indivíduo (Mangram *et al.*, 1999). Posto isto, antes de 1800 as cirurgias apenas eram executadas em condições de risco de vida, dando-se primazia à rapidez de execução em detrimento da técnica, uma vez que não se encontravam disponíveis protocolos de anestesia ou antissepsia (Alexander, 1985).

Em 1846, a introdução da anestesia por William Morton permitiu um grande avanço na técnica cirúrgica, possibilitando uma preparação mais deliberada das cirurgias e também um melhor manejo da dor dos doentes. No entanto, os procedimentos eletivos eram pouco frequentemente praticados devido às complicações infecciosas que surgiam após procedimentos cirúrgicos complexos (Alexander, 1985). Só após 1860, quando o cirurgião inglês Joseph Lister (1827-1912) recorreu pela primeira vez ao uso de um agente antisséptico para preparação da pele antes de uma cirurgia (Hemani & Lepor, 2009), se verificou uma descida substancial na morbidade por infecções pós-cirúrgicas (Mangram *et al.*, 1999; Newsom, 2008).

No seguimento do trabalho de Louis Pasteur, que demonstrou que a decomposição dos tecidos é causada por organismos microscópicos, Lister avançou a teoria da disseminação de microrganismos nas feridas cirúrgicas como responsáveis pela morte no período pós-cirúrgico. Assim, começou a tratar estas feridas cirúrgicas com um ácido carbólico (fenol) com o intuito de prevenir a decomposição dos tecidos e consequentes complicações infecciosas (Hemani & Lepor, 2009).

Com esta descoberta, a incidência da sépsis pós-cirúrgica reduziu substancialmente. Lister permitiu uma grande mudança na visão da cirurgia, passando de uma atividade associada a infecção e morte para uma disciplina que consegue eliminar sofrimento e prolongar a esperança de vida dos doentes (Hemani & Lepor, 2009; Newsom, 2008). Ficou assim claro que a preparação da pele é uma pratica cirúrgica vital (Sidhwa & Itani, 2015), tendo sido este o impulso que catalisou a adoção das técnicas de assepsia modernas, que incluem a

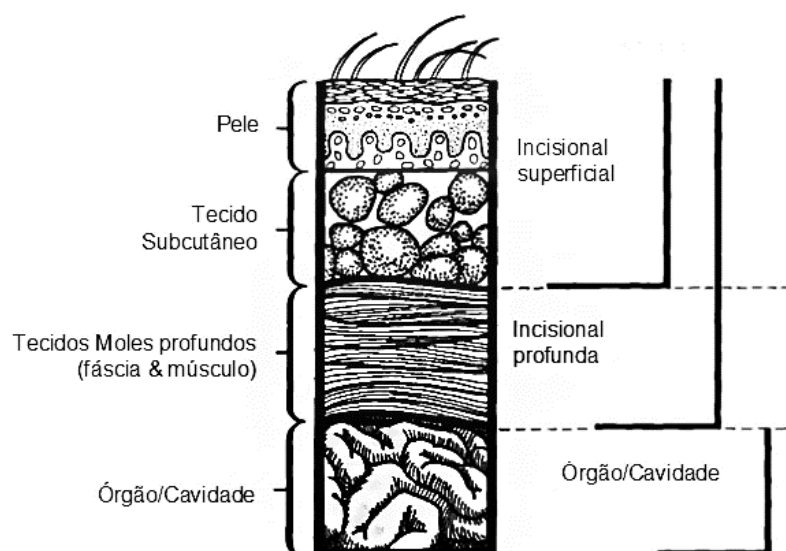
preparação estéril do indivíduo, assim como a esterilização dos instrumentos e o uso de vestuário cirúrgico e de luvas esterilizadas descartáveis (Hemani & Lepor, 2009).

2.2 Infecção do local cirúrgico

Uma infecção do local cirúrgico define-se como uma infecção que ocorre no doente submetido a cirurgia, ao nível do local intervencionado. Estas infeções surgem após a manipulação invasiva de tecidos superficiais ou profundos, ou ainda, de órgãos ou cavidades (World Health Organization, 2009).

A identificação de infeções do local cirúrgico envolve a interpretação de sinais clínicos e laboratoriais, sendo por isso crucial recorrer a um plano de vigilância com definições consistentes e protocoladas. De acordo com a OMS (2016), existem múltiplas definições de infeções do local cirúrgico, assim como avaliações sistemáticas diferentes. Contudo, mais de um terço dos estudos publicados até à data recorrem às definições do sistema Nacional de Vigilância de Infeções Nosocomiais (NNIS) do CDC dos Estados Unidos da América, que classifica as infeções do local cirúrgico em incisionais e/ou de órgãos ou cavidades de acordo com a sua localização, como representado na Figura 1 ((Mangram *et al.*, 1999; World Health Organization, 2016).

Figura 1 – Anatomia de infeções do local cirúrgico e a sua classificação (adaptado de Horan *et al.*, 1992)



De acordo com este sistema, Mangram *et al.* (1999) classificam uma infecção incisional superficial como aquela que ocorre nos primeiros 30 dias após a cirurgia e envolvendo apenas

a pele e o tecido subcutâneo no local da incisão com a presença de apenas um dos seguintes parâmetros:

1. Presença de exsudado a partir da incisão superficial, com ou sem confirmação laboratorial de infecção;
2. Isolamento de organismos a partir de uma amostra do líquido ou do tecido, obtida assepticamente da zona superficial da incisão;
3. A presença de pelo menos um dos seguintes sinais ou sintomas de infecção: dor ou desconforto, edema local, rubor ou calor; e a superfície incisional deliberadamente deixada aberta pelo cirurgião, a menos que o resultado da cultura seja negativo;
4. Diagnóstico de infecção incisional superficial pelo cirurgião ou pelo clínico assistente (Mangram *et al.*, 1999).

Não deverão ser considerados como infecções do local cirúrgico os abscessos dos pontos de sutura com a presença de uma inflamação mínima e o corrimento confinado aos locais de penetração da sutura; infecção do local de uma episiotomia ou circuncisão de um recém-nascido (para as quais se encontram disponíveis critérios específicos) (Gaynes & Horan, 1996); infecção de ferida por queimadura (que também possuem critérios específicos) (Gaynes & Horan, 1996); e infecção incisional que se estenda até às camadas de fáscia e músculo (Mangram *et al.*, 1999).

Por outro lado, uma infecção incisional profunda é aquela que ocorre nos primeiros 30 dias após a cirurgia, se não for aplicado nenhum implante; ou então dentro de um ano, se for aplicado um implante e este se mantiver no local inicial e a infecção estiver relacionada com a cirurgia. Este tipo de infecção envolve os tecidos moles (fáscia e camadas musculares) da incisão, e pelo menos um dos seguintes parâmetros:

1. Presença de exsudado a partir da incisão profunda, mas não com origem em órgãos ou cavidades;
2. Deiscência espontânea de sutura profunda ou incisão deliberadamente deixada aberta pelo cirurgião quando o doente apresenta febre, dor localizada ou desconforto, a menos que o resultado da cultura seja negativo;
3. Presença de abscesso ou outra evidência de infecção que envolva a incisão profunda, detetado no exame físico, durante uma nova cirurgia ou por exame complementar, como histopatológico ou radiográfico;
4. Diagnóstico de infecção incisional profunda pelo cirurgião ou pelo clínico assistente (Mangram *et al.*, 1999).

Devem ser referidas como infecção incisional profunda, as que envolvem quer a região superficial quer a região profunda, bem como as infecções do local cirúrgico de órgãos ou cavidades que drenem pela incisão.

Tal como uma infecção incisional profunda, a infecção do local cirúrgico de órgão ou cavidade também ocorre nos primeiros 30 dias após a cirurgia, se não for aplicado nenhum implante, ou dentro de um ano se for aplicado um implante, este se mantiver no local inicial e a infecção estiver relacionada com a cirurgia. No entanto, este tipo de infecção envolve qualquer parte da anatomia (órgãos ou cavidades), para além da incisão cirúrgica, que foi aberta ou manipulada durante a cirurgia e pelo menos um dos seguintes acontecimentos:

1. Presença de exsudado a partir de um dreno colocado no órgão ou cavidade;
2. Isolamento de microrganismos a partir de uma amostra do fluido ou tecido no órgão ou cavidade colhida assepticamente;
3. Presença de abcesso ou outra evidência de infecção que envolva o órgão ou cavidade, detetado ao exame físico, durante uma nova cirurgia ou por exame complementar, como histopatológico ou radiográfico;
4. Diagnóstico de infecção de órgão/cavidade pelo cirurgião ou clínico assistente.

De acordo com as Diretivas da OMS, dois terços das infecções do local cirúrgico são incisionais e apenas um terço ocorre ao nível dos órgãos. Este tipo de infecções conduzem a um prolongamento do período de hospitalização e estão associadas a uma maior taxa de mortalidade, correspondendo a cerca de 15% de todas as infecções nosocomiais (World Health Organization, 2009).

No contexto da medicina veterinária, uma infecção do local cirúrgico é também um risco inerente a qualquer cirurgia pela quebra inevitável da barreira do hospedeiro (Eugster, Schawalter, Gaschen, & Boerlin, 2004). Para além de promover o aumento da morbilidade, mortalidade e do período de hospitalização, e consequentemente dos custos de tratamento, é também um fator ansiogénico para o tutor do animal e para o clínico responsável (Turk, Singh, & Weese, 2015).

O risco de contrair uma infecção após a contaminação microbiana do local cirúrgico depende da concentração e do potencial patogénico do agente, bem como do estado imunitário do doente. Para a ocorrência de infecção do local cirúrgico é necessário haver contaminação microbiana do mesmo (Mangram *et al.*, 1999). Foi demonstrado que o risco para a ocorrência de infecção do local cirúrgico aumenta significativamente quando se verifica uma contaminação do local cirúrgico com uma concentração superior a 10^5 microrganismos por grama de tecido (Krizek & Robson, 1975; Mangram *et al.*, 1999). Ainda assim, em certos casos a quantidade de microrganismos necessária para promover infecção pode ser muito inferior quando estão presentes materiais estranhos no local cirúrgico, como por exemplo fios de suturas. Em 1961, James e Macleod demonstraram que para staphylococci bastam 100 microrganismos por grama de tecido para que ocorra infecção na presença de suturas de seda (James & Macleod, 1961). Além disso, os microrganismos podem apresentar a capacidade de produzir toxinas ou outras substâncias com capacidade para invadir os tecidos do hospedeiro, afetando-os e

podendo conduzir à morte. No caso das bactérias gram-negativas produtoras de endotoxinas, por exemplo, ocorre a estimulação da produção de citocinas pelos lipopolissacáridos (LPS), que, por sua vez, desencadeiam uma resposta imunitária exacerbada que conduz a falência multiorgânica (Morrison & Ryan, 1987).

2.3 Microbiota mais frequentemente isolada em infecções do local cirúrgico

A maioria das infecções do local cirúrgico é provocada por agentes comensais e patogênicos provenientes da microbiota do doente presente na pele, membranas mucosas e vísceras ocas (Altemeier, Culbertson, & Hummel, 1968), que atingem o local cirúrgico quando este é incisionado. No caso de a infecção ocorrer devido à presença de microbiota endógena, observa-se geralmente a ocorrência de cocci aeróbios gram-positivos, como staphylococci, podendo também ocorrer microrganismos de origem fecal, incluindo bactérias anaeróbias e aeróbias gram-negativas, quando o local cirúrgico se localiza no períneo ou virilha. Se um órgão do trato gastrointestinal for aberto, os organismos mais frequentemente isolados a partir de infecção do local cirúrgico são bacilos gram-negativos, como *Escherichia coli*, organismos gram-positivos como enterococci, e por vezes, anaeróbios como *Bacillus fragilis* (Mangram *et al.*, 1999).

Uma infecção do local cirúrgico também pode ter início a partir de um foco exógeno distante, o qual é responsável pela inoculação dos agentes patogênicos no local. Este tipo de fontes incluem a equipa cirúrgica, o ambiente do bloco cirúrgico e todos os equipamentos e instrumentos cirúrgicos que entram em contacto com o campo estéril. A microbiota exógena, é primordialmente constituída por microrganismos aeróbios, principalmente gram-positivos, como staphylococci e streptococci (Mangram *et al.*, 1999).

A presença de fungos, quer de origem endógena quer exógena, é bastante rara e o seu papel na patogénese das feridas cirúrgicas é ainda pouco compreendido (Giamarellou & Antoniadou, 1996).

De acordo com o sistema NNIS, a distribuição de agentes patogênicos isolados a partir de infecções de local cirúrgico não variou muito durante a década de 1990. Para além dos isolados mais frequentes (*Staphylococcus aureus*, staphylococci coagulase-negativos, *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*), tem-se verificado um aumento na proporção de isolados com perfil de resistência a antibióticos, como por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA), e de leveduras como *Candida albicans*. Este aumento pode estar relacionado com o aumento do número de doentes graves ou imunodeprimidos que são submetidos a cirurgia e com o uso generalizado de antibióticos de largo espectro nas medicinas (Mangram *et al.*, 1999).

Tal como na medicina humana, na medicina veterinária as infecções do local cirúrgico sempre foram alvo de preocupação desde os primórdios da cirurgia; porém, tem-se verificado um

maior interesse na resolução desta problemática devido à disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos e à execução de procedimentos cada vez mais invasivos em doentes imunodeprimidos (Turk *et al.*, 2015). De acordo com Turk *et al.* (2015), os rácios de infeções do local cirúrgico em cães e gatos variam entre os 3 e os 10%, sendo que os custos associados à saúde e à economia não foram ainda quantificados. Os estudos realizados nesta área são frequentemente limitados pelo número da população amostrada, pelo carácter retrospectivo do delineamento do estudo, pelo uso de medidas vigilância passivas e pela falha no uso de definições padronizadas para deteção de infeções do local cirúrgico (Turk *et al.*, 2015).

No cão, tal como no homem, o risco de ocorrência de infeção do local cirúrgico é superior quando são aplicados implantes, uma vez que estes, para além de poderem funcionar como veículo de agentes microbianos, também permitem o desenvolvimento de biofilmes, os quais são comunidades bacterianas envolvidas por uma matriz protetora constituída por substâncias diversas tais como exopolissacáridos, proteínas, ácidos teicóicos e ácido desoxirribonucleico (ADN) extracelular. As bactérias presentes nestes biofilmes são mais propícias a resistir ao sistema imunitário inato e adquirido do indivíduo, bem como à terapêutica antimicrobiana e à aplicação de biocidas (Arciola, Campoccia, Speziale, Montanaro, & Costerton, 2012). Um estudo recente (Singh, Walker, Rousseau, & Weese, 2013) demonstrou que *Staphylococcus pseudintermedius* produz biofilmes que desempenham um papel importante na patogenicidade das infeções do local cirúrgico (Singh *et al.*, 2013). A formação de biofilmes por *S. pseudintermedius* e por *S. aureus* é um factor de virulência significativo, sendo estas espécies capazes de provocar infeções crónicas associadas a implantes (Quinn *et al.*, 2011).

Assim, as infeções do local cirúrgico estão a tornar-se cada vez mais complicadas de resolver, uma vez que alguns agentes patogénicos multirresistentes oportunistas se têm disseminado rápida e amplamente nos últimos anos, sendo a causa principal de infeções do local cirúrgico em alguns centros de medicina veterinária (Nelson, 2011; Singh *et al.*, 2013). Apesar de em medicina veterinária ainda não ter sido investigada a influência deste tipo de infeções nas taxas de morbilidade e mortalidade, em medicina humana foi demonstrado que estas infeções estão associadas a maiores taxas de morbilidade e mortalidade (Nelson, 2011). Uma preocupação particular em cães e gatos centra-se na rápida emergência de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à meticilina (MRSP) (Singh *et al.*, 2013).

2.4 Staphylococci

Dada a importância dos staphylococci no desenvolvimento de infecções do local cirúrgico e uma vez que se tem verificado um aumento no número destas infecções por microrganismos patogênicos resistentes a antibióticos, é importante caracterizar os mais isolados (Mangram *et al.*, 1999).

Os principais agentes isolados de infecções do local cirúrgico em cães são staphylococci, devendo-se tal à sua natureza comensal e oportunista (Verwilghen & Singh, 2015).

Até 2007, acreditava-se que *Staphylococcus intermedius* seria o principal agente patogênico, contudo com o surgimento da reclassificação molecular demonstrou-se que o principal agente isolado de infecções em canídeos é *Staphylococcus pseudintermedius* (Sasaki *et al.*, 2007). Esta espécie emergiu rapidamente como a principal causa de infecções do local cirúrgico no cão por todo o mundo, verificando-se uma preocupação crescente com o surgimento de resistências à metilina e outros antimicrobianos (Verwilghen & Singh, 2015).

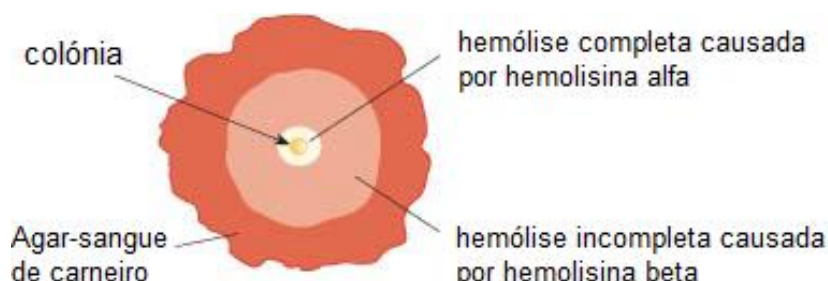
A espécie *S. pseudintermedius* é correspondente a *S. aureus* em humanos, ao ser a principal causa de infecções do local cirúrgico. Contudo, *S. aureus* apesar de também ser um agente isolado a partir de infecções do local cirúrgico em canídeos, a sua ocorrência verifica-se com menor frequência (Verwilghen & Singh, 2015).

Num estudo em que se procurou quantificar e identificar as bactérias presentes nas mãos de cirurgiões veterinários de pequenos animais, 5% destes foram identificados como sendo portadores de *S. pseudintermedius*, enquanto que nenhum outro grupo de veterinários ou funcionários na área saúde humana foi considerado portador do mesmo, demonstrando assim a disseminação desta bactéria na clínica de pequenos animais. A espécie *S. pseudintermedius* tem um baixo potencial zoonótico quando comparada com *S. aureus*, apesar de serem reportados casos de infecções zoonóticas para ambos (Verwilghen & Singh, 2015).

As espécies de staphylococci são normalmente categorizadas pela sua aparência, padrão hemolítico, perfil bioquímico e padrão de restrição genómica do ARN ribossomal (Quinn *et al.*, 2011). O isolamento destas espécies é normalmente feito em meio de agar suplementado com sangue de carneiro, no qual apresentam geralmente colónias brancas e opacas (Quinn, Carter, Markey, & Carter, 1993). Neste meio reconhecem-se quatro tipos de hemolisinas, alfa, beta, gama e delta, variando a sua presença conforme a espécie. Os isolados de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* normalmente apresenta alfa e beta-hemólise, o que se traduz por uma dupla hemólise; ou seja, pela formação de um estreito halo hemolítico completo junto à colónia da responsabilidade da hemolisina alfa, e outro halo incompleto mais amplo e afastado da colónia da responsabilidade da hemolisina beta (Figura 2). Os isolados de *S. aureus* de humanos e bovinos apresentam colónias amarelo-douradas neste meio enquanto que os

isolados desta espécie provenientes de outros animais apresentam colónias brancas (Quinn *et al.*, 2011).

Figura 2 – Dupla hemólise de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* em meio agar suplementado com sangue de carneiro (adaptado de Quinn *et al.*, 2011)



Torna-se importante distinguir entre *S. aureus* e *S. pseudintermedius* em diversas condições clínicas, em cães e gatos. Esta diferenciação é feita a partir de testes bioquímicos, estando as diferenças resumidas na Tabela 1 (Quinn *et al.*, 2011).

Tabela 1 – Diferenciação entre *S. aureus* e *S. pseudintermedius* (adaptado de Quinn *et al.*, 2011)

Espécie	Cor da colónia	Hemólise (meio agar - sangue carneiro)	Coagulase		Produção de acetoina	Utilização da Maltose
			Teste no tubo	Teste Slide		
<i>S. aureus</i>	Amarelo*/Branco	+	+	+	+	+
<i>S. pseudintermedius</i>	Branco	+	+	-	+	+/-

*amarelo para amostras de humano ou ruminante

A espécie *S. aureus*, em meio agar roxo contendo 1% de maltose e bromocresol roxo como indicador de pH, utiliza a maltose, produzindo um ácido que muda a cor das colónias e do meio de roxo para amarelo. Já *S. pseudintermedius* é um fraco fermentador da maltose, não promovendo assim a alteração da cor do meio (Quinn *et al.*, 2011).

Para além dos já referidos, *Staphylococcus epidermidis* é um agente frequentemente isolado a partir de amostras cutâneas em canídeos, representando cerca de 90% da microbiota aeróbia residente da pele. Produz pequenas colónias brancas em agar sangue e é uma bactéria coagulase-negativa, o que facilmente o distingue de outros staphylococci (Cogen, Nizet, & Gallo, 2008; Quinn *et al.*, 2011).

Na última década, tem ocorrido um aumento acentuado no número de infeções por estirpes resistentes a antibióticos, como MRSA, quer em ambiente hospitalar quer na comunidade; e

ainda por estirpes resistentes à vancomicina ou com resistência intermédia (Cogen *et al.*, 2008). *Staphylococcus aureus* é relativamente resistente aos péptidos antimicrobianos produzidos pelas células epiteliais e à fagocitose, devendo-se esta resistência em parte a alterações na carga da superfície das células bacterianas (Cogen *et al.*, 2008). A incidência de MRSP está a aumentar, constituindo uma problemática relevante, ainda mais preocupante do que o MRSA, devido ao seu carácter de multirresistência (Verwilghen & Singh, 2015).

A resistência à meticilina é mediada pelo gene *mecA* que confere resistência contra todos os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas e carbapenemos), bem como a diversos outros antimicrobianos, tais como lincosamidas, fluoroquinolonas, macrólidos, tetraciclina e trimetoprim-sulfonamidas, constituindo assim um desafio terapêutico (Stull & Weese, 2015; Verwilghen & Singh, 2015).

Em medicina veterinária os fatores de risco para infeções por MRSA não estão bem estudados, mas estas infeções ocorrem geralmente em animais que fizeram uso prévio de agentes antimicrobianos, que tiveram hospitalização prévia, que estiveram hospitalizados mais de três dias, e ainda em animais cujos tutores estão ligados à área da medicina veterinária ou humana (Stull & Weese, 2015).

É importante notar que uma proporção extremamente elevada de médicos veterinários está colonizada com MRSA quando comparados com o público em geral, podendo funcionar como fonte de infeção para os seus doentes (Hanselman *et al.*, 2006). Quanto ao MRSP, este tem-se disseminado rapidamente nas populações de canídeos, sendo o principal agente patogénico oportunista do cão. É a principal causa de infeções do local cirúrgico em algumas regiões, e o seu tratamento é muito dificultado pelos elevados níveis de resistências antimicrobianas que apresenta (Stull & Weese, 2015). À semelhança do que se verifica para MRSA, a exposição prévia a antibioterapia também constitui um fator de risco para infeções por MRSP (Stull & Weese, 2015).

Nos centros de medicina veterinária atendem-se diariamente diversos animais, saudáveis ou não, que podem estar a disseminar microrganismos potencialmente patogénicos e até mesmo zoonóticos. Assim, o nível de risco será determinado em parte pela população de animais atendidos, agentes patogénicos em circulação, adesão do tutor às regras da medicina preventiva e ainda às normas de controlo de infeção do centro de medicina veterinária, bem como pelo cumprimento das mesmas pela equipa de funcionários (Stull & Weese, 2015).

2.5 Medidas de prevenção

Para um melhor controlo da morbilidade e de despesas associadas ao desenvolvimento de infeções do local cirúrgico, devem aplicar-se algumas medidas preventivas. Muitas destas medidas ainda não foram validadas para a cirurgia veterinária, mas constituem adaptações das recomendações para a cirurgia humana, baseadas em vários níveis de evidência (Nelson, 2011).

As medidas de prevenção são ações intencionalmente tomadas tendo em vista a redução do risco de infeção do local cirúrgico, focando-se essencialmente em diminuir diretamente a ocorrência de contaminação bacteriana dos tecidos do doente ou dos instrumentos cirúrgicos estéreis, bem como no aumento ou melhoria das defesas do doente face a infeções. Para tal, podem aplicar-se medidas adjuntivas, como a profilaxia antimicrobiana e a dissecação exclusiva dos tecidos estritamente necessários, sem traumatizar outros que se encontrem justapostos (Mangram *et al.*, 1999; Owens & Stoessel, 2008).

Além disso, apesar da assepsia da pele com um agente antisséptico ser uma medida eficaz para prevenção de infeções do local cirúrgico promovidas pela microbiota da pele, é pouco provável que tenha o mesmo efeito em microrganismos oriundos dos sistemas gastrointestinal, urinário, biliar ou respiratório (Hidron *et al.*, 2014; Owens & Stoessel, 2008). Como tal, é necessário recorrer a medidas de prevenção complementares, que, de acordo com as novas recomendações da OMS (World Health Organization, 2016) e com base nas diretivas do CDC (Berríos-Torres *et al.*, 2017; Mangram *et al.*, 1999), podem dividir-se em pré-cirúrgicas, intra-cirúrgicas e pós-cirúrgicas.

As medidas pré-cirúrgicas incluem a preparação do doente e da equipa cirúrgica (Mangram *et al.*, 1999). Relativamente ao doente, deve sempre que possível: 1) identificar-se e tratar-se infeções remotas, adiando cirurgias eletivas; 2) proceder-se ao controlo adequado da glicémia em indivíduos diabéticos e não diabéticos e evitar hiperglicémias peri-operatórias; 3) se for necessário tricotomizar, este procedimento deve ser realizado imediatamente antes da cirurgia, de preferência com tosquiadora, apenas em locais que interfiram com a cirurgia; e 4) deve limpar-se e lavar-se bem a região em redor da incisão com um agente antisséptico apropriado para a preparação da pele, de forma a eliminar a maioria da contaminação antes da cirurgia (Berríos-Torres *et al.*, 2017; Mangram *et al.*, 1999).

Em medicina veterinária, à semelhança do indicado para medicina humana (Berríos-Torres *et al.*, 2017), em alguns casos recomenda-se mesmo o banho no dia anterior à cirurgia tendo em vista remover pelos soltos, detritos e ectoparasitas. Sempre que possível, deve adiar-se cirurgias eletivas aquando da presença concomitante de infeções remotas ao local cirúrgico (Fossum, 2012).

Em termos de profilaxia antimicrobiana, deve recorrer-se a esta prática apenas quando indicado, selecionando o agente empiricamente de acordo com a eficácia contra os agentes

patogénicos mais frequentemente associados ao procedimento a realizar, sendo que a Vancomicina nunca deve ser usada como composto profilático (Berríos-Torres *et al.*, 2017; World Health Organization, 2016). A dose inicial deve ser administrada de modo a atingir as concentrações bactericidas no sangue e nos tecidos aquando da incisão, permitindo ainda a sua manutenção durante o procedimento e até algumas horas após o encerramento da ferida cirúrgica (Berríos-Torres *et al.*, 2017; Mangram *et al.*, 1999). De acordo com as novas diretrizes da OMS, a administração profilática de antibiótico deve ocorrer nos 120 minutos precedentes à incisão, considerando o seu tempo de semivida (World Health Organization, 2016).

No caso de cirurgias colorretais eletivas, deve-se proceder à administração de antibioterapia oral, combinada com a preparação do cólon com enemas e agentes catárticos anteriormente ao procedimento, e administrar antibióticos orais não-absorvíveis em doses divididas, um dia antes da cirurgia (Mangram *et al.*, 1999; World Health Organization, 2016). Em casos de cesarianas, deve-se administrar o antibiótico profilático apropriado antes da incisão da pele (Berríos-Torres *et al.*, 2017), contrariando o anteriormente defendido de administrar antibióticos imediatamente a seguir à clampagem do cordão umbilical (Mangram *et al.*, 1999). Relativamente à equipa cirúrgica, é importante proceder à assepsia das mãos e do antebraço da equipa de cirurgiões. Estes devem manter as unhas curtas, não usar unhas postiças ou vernizes e realizar a preparação pré-cirúrgica das mãos e antebraço com um agente antisséptico apropriado, durante pelo menos 2 a 5 minutos (World Health Organization, 2009). Após a preparação, a equipa deve manter as mãos elevadas e longe do corpo, limpar as mãos com uma toalha estéril e vestir equipamento e luvas estéreis. É ainda importante educar e encorajar a equipa cirúrgica a reportar prontamente quem tiver sinais ou sintomas de infeções transmissíveis, devendo-se obter amostras apropriadas dos membros da equipa que apresentem lesões supurativas de pele para cultura posterior, afastando-os da cirurgia até ser possível excluir a hipótese de infeção. Os membros da equipa que se encontrem colonizados com microrganismos como *S. aureus* ou Streptococci do grupo A não devem ser excluídos dos procedimentos, a não ser que se encontre demonstrada a sua ligação epidemiológica à disseminação dos mesmos. Por fim, quando algum membro da equipa apresenta uma possível infeção transmissível, é importante desenvolver políticas de responsabilidade dos cuidados com o doente (Mangram *et al.*, 1999).

Relativamente às medidas intra-cirúrgicas recomendadas pelo CDC para prevenção de infeções do local cirúrgico, estas incluem: 1) ventilação, limpeza e desinfeção das superfícies da sala de cirurgia; 2) colheita de amostras microbiológicas; 3) esterilização do material cirúrgico; 4) manutenção da assepsia durante a técnica cirúrgica; e 5) uso de vestuário adequado (Mangram *et al.*, 1999). A ventilação tem como objetivo manter uma pressão positiva no bloco cirúrgico, respeitando os corredores e áreas adjacentes. Devem realizar-se no mínimo 15 mudanças de ar por hora, sendo que 3 devem ser de ar fresco. É ainda

recomendado não utilizar radiações ultravioletas intra-cirurgicamente como prevenção de infeções do local cirúrgico no bloco, devendo-se manter as portas fechadas, exceto para a passagem de equipamento, pessoal e do doente (Mangram *et al.*, 1999).

A limpeza e desinfeção das superfícies da sala de cirurgia são também importantes, devendo-se limpar as zonas sujas ou contaminadas com sangue ou outros fluídos biológicos com um desinfetante apropriado antes da cirurgia seguinte. Todos os instrumentos cirúrgicos utilizados devem ser esterilizados de acordo com as diretivas em vigor, sendo que esterilizações rápidas devem ser realizadas apenas para instrumentos a utilizar imediatamente. Os elementos da equipa cirúrgica devem usar máscara cirúrgica que cubra a totalidade da boca e nariz sempre que entrarem num bloco cirúrgico ou sempre que os instrumentos estéreis estiverem expostos, bem como touca cirúrgica que apanhe todo o cabelo, e luvas estéreis a calçar após o vestuário cirúrgico. O vestuário e os campos cirúrgicos devem ser constituídos por material impermeável e devem ser trocados sempre que se encontrem sujos ou contaminados com sangue ou outros materiais potencialmente infecciosos (Mangram *et al.*, 1999).

Relativamente à assepsia e técnica cirúrgica, é importante realizar protocolos de assepsia aquando da colocação de dispositivos endovenosos ou da administração de fármacos por via endovenosa. Os tecidos devem ser manuseados de forma suave, mantendo a hemostase efetiva e minimizando a ocorrência de tecidos desvitalizados e presença de corpos estranhos, como suturas e tecido necrosado, e não deixando espaços mortos. Quando o local cirúrgico se encontrar gravemente contaminado, deve recorrer-se ao encerramento primário tardio da pele, ou permitir o seu encerramento por segunda intenção. Se for necessário drenar, deve usar-se um dreno de sucção fechado, colocado através de uma incisão separada, distante da incisão cirúrgica, o qual deve ser removido rapidamente (Mangram *et al.*, 1999).

Por fim, relativamente a medidas pós-cirúrgicas, o CDC recomenda cuidados e vigilância das incisões (Mangram *et al.*, 1999). As incisões que tenham sido encerradas primariamente com fios de sutura estéreis devem ser protegidas durante 24 a 48h, sendo ainda importante proceder à limpeza das mãos antes e após o contacto com o local intervencionado. Em termos de vigilância, deve ter-se em consideração as definições do CDC para infeção do local cirúrgico de modo a ser possível identificá-las rapidamente em doentes internados e em ambulatório. Em indivíduos internados é possível recorrer-se à observação direta prospetiva, deteção indireta prospetiva ou mesmo a uma combinação dos métodos diretos e indiretos durante a hospitalização (Mangram *et al.*, 1999).

O CDC recomenda ainda que se proceda à determinação periódica dos rácios de infeção do local cirúrgico específicos para cada cirurgia, que devem ser comunicados aos membros da equipa cirúrgica (Mangram *et al.*, 1999).

3. ASSEPSIA PRÉ-CIRÚRGICA DA PELE: AGENTES ANTISSEPTICOS

A assepsia cirúrgica é uma etapa fundamental na prevenção de infecções do local cirúrgico. No entanto, apesar do avanço nas técnicas de assepsia, as infecções cirúrgicas mantêm-se um problema desafiante e dispendioso (Sidhwa & Itani, 2015). Uma vez que 80% dos agentes isolados de infecções do local cirúrgico provêm da pele do doente (World Health Organization, 2009), as recomendações do CDC para prevenção de infecções no local cirúrgico, referem que se deve recorrer a agentes e técnicas de assepsia adequadas para preparação da pele (CDC, 2014). Como tal, a assepsia da pele com um agente antisséptico previamente à realização de procedimentos transcutâneos invasivos é uma prática estabelecida (Mangram *et al.*, 1999; NICE, 2008). Porém, a escolha do agente antisséptico a utilizar para a redução do risco de infecção cirúrgica mantém-se ainda controversa (Sidhwa & Itani, 2015). Este facto pode ser explicado pela grande diversidade de agentes disponíveis e pela falta de estudos controlados referentes a infecções do local cirúrgico específicas por cirurgia (Mangram *et al.*, 1999).

No âmbito da cirurgia veterinária de pequenos animais, em 1990, Osuna *et al.*, compararam o efeito antisséptico de uma solução aquosa de iodopovidona a 7,5% com o de uma solução aquosa de gluconato de clorexidina a 4% e ainda com o de uma solução alcoólica de gluconato de clorexidina a 4%, não encontrando diferenças estatisticamente significativas entre os três agentes (Osuna, DeYoung, & Walker, 1990). Posteriormente, em 1997, Gibson *et al.*, ao compararem o efeito antisséptico de uma solução alcoólica de iodopovidona a 7% com o de uma solução gluconato de clorexidina a 4% (SteriStat Chlorhexidine Gluconate scrub 4%), seguida de assepsia com uma solução de gluconato de clorexidina a 20%, chegaram à mesma conclusão, ao também não identificarem diferenças estatisticamente significativas entre o protocolo que aplicava a iodopovidona e o protocolo que aplicava a clorexidina (SteriStat Chlorhexidine Gluconate solution 20%) (Gibson, Donald, Hariharan, & McCarville, 1997). Ainda assim, as novas diretivas estabelecidas pela OMS para a assepsia pré-cirúrgica da pele em medicina humana recomendam o uso de soluções antissépticas alcoólicas à base de gluconato de clorexidina (World Health Organization, 2016) e as novas diretivas do CDC recomendam o uso de soluções alcoólicas (Berríos-Torres *et al.*, 2017).

Considerando isto, a escolha do agente deve basear-se no conhecimento do cirurgião sobre a eficácia do produto, custo e facilidade de utilização (Hemani & Lepor, 2009). Um outro fator a ter em consideração é a localização da cirurgia. Numa cirurgia urológica, por exemplo, existe uma grande variabilidade de procedimentos e de regiões que podem ser intervencionadas, cada uma com a sua microbiota endógena específica e com diferentes características da pele. Estes fatores influenciam de um modo distinto o risco de infecção do local cirúrgico, e assim, a escolha do melhor agente antisséptico (Hemani & Lepor, 2009).

Os agentes antissépticos são biocidas, ou seja, são agentes químicos geralmente de largo espectro, com a capacidade de inativar microrganismos. Assim, têm a capacidade de destruir

ou de inibir a multiplicação microbiana em tecidos vivos (McDonnell & Russell, 1999). O agente antisséptico ideal deve inativar todas as bactérias, fungos, vírus, protozoários e esporos presentes na pele; deve ser hipoalergênico; não tóxico e não absorvível; apresentar uma atividade residual após a sua aplicação e ser seguro para uso repetido (Dumville *et al.*, 2015).

Os produtos antissépticos disponíveis atualmente não conseguem eliminar a totalidade dos microrganismos, tendo sido já descrito o isolamento de staphylococci coagulase-negativos após três aplicações de agentes como álcool-iodado (Garibaldi *et al.*, 1988). Como tal, a Administração de Alimentos e Medicamentos (FDA) dos Estados Unidos da América, define um desinfetante de pele como sendo uma preparação de rápida ação, com um largo espectro ação e com poder antisséptico persistente, capaz de reduzir significativamente o número de microrganismos numa pele intacta (World Health Organization, 2009).

Os biocidas podem ser divididos, de acordo com o seu mecanismo de ação, em: 1) eletrófilos, e 2) de atuação na membrana (Tabela 2). O grupo dos eletrófilos inclui os oxidantes, tais como os halogéneos e os peróxidos, e os eletrófilos propriamente ditos. Estes últimos incluem os iões inorgânicos como a prata, o cobre e o mercúrio e biocidas orgânicos como o formaldeído e as isotiazolonas. Os oxidantes atuam rapidamente oxidando a matéria orgânica; enquanto que os agentes eletrofílicos reagem covalentemente com os nucleófilos celulares, inativando enzimas e formando radicais livres no espaço intracelular.

O grupo dos biocidas de atuação na membrana inclui biocidas líticos, tais como os compostos quaternários, as biguanidas, os fenóis e os álcoois, e biocidas protonóforos que compreendem os parabenos, os ácidos fracos e a piritiona. Os agentes líticos destabilizam a membrana conduzindo à sua rápida lise celular, enquanto que os ácidos fracos como o ácido benzoico e o ácido sórbico interferem com a capacidade da membrana celular em manter um balanço de pH, resultando na sua acidificação e destruição do seu metabolismo (Chapman, 2003).

Tabela 2 – Mecanismos de ação dos biocidas (adaptado de Chapman, 2003)

BIOCIDAS			
Electrófilos		De actuação na membrana	
Oxidantes	Electrófilos	Líticos	Protonóforos
Halogéneos Peróxidos	Formaldeído Libertadores de FA Isotiazolonas Bronopol Cu, Hg, Ag	Quaternários Biguanidas Fenóis Álcoois	Parabenos Ácidos fracos Piritiona

Atualmente, os agentes mais utilizados para assepsia pré-cirúrgica da pele incluem os produtos que contêm iodóforos ou gluconato de clorexidina. Estes agentes podem estar presentes em soluções aquosas ou alcoólicas (Hemani & Lepor, 2009). A iodopovidona e o

gluconato de clorexidina são as soluções aquosas mais amplamente utilizadas (Digison, 2007), enquanto que o etanol e o álcool isopropílico são as soluções alcoólicas mais eficazes para assepsia cutânea (Hibbard, 2005).

Assim, os 3 agentes antissépticos mais utilizados são o gluconato de clorexidina, iodopovidona/povacrilex de iodo e álcool isopropílico. No entanto, existem outras opções, referidas na Tabela 3 (Sidhwa & Itani, 2015).

Tabela 3 – Agentes antissépticos disponíveis para assepsia pré-cirúrgica da pele (adaptado de Sidhwa & Itani, 2015)

Agente antisséptico	Comentários
Tintura de iodo	Raramente usado; novos iodóforos mais seguros e eficazes.
Triclosan	Eficácia como antisséptico de pele não provada.
Paraclorometaxilenol	Usado para assepsia das mãos e antebraço; eficácia inferior à clorexidina e iodopovidona.
Hipoclorito de Sódio	Desinfetante químico excelente para superfícies não porosas; efeito limitado na pele.
Gluconato de Clorexidina	Largo espectro de ação; ação persistente na pele; mantém atividade quando em contacto com matéria orgânica; absorção sistémica mínima; quando usado diretamente, tem efeito irritativo para o conduto auditivo, olhos e tecido nervoso; fraco efeito esporicida.
Iodopovidona	Largo espectro de ação, incluindo atividade esporicida; atividade diminuída quando em contacto com matéria orgânica; persistência na pele variável; efeito irritativo na pele; ação lenta.
Povacrilex de iodo	Largo espectro de ação da iodopovidona associado a um copolímero de acrilato; resiste à remoção pela matéria orgânica e melhora a persistência na pele.
Álcool isopropílico	Largo espectro de ação; ação rápida; fraco efeito esporicida; sem persistência na pele após evaporação; promove a desidratação da pele e das membranas mucosas; altamente inflamável.

As soluções iodóforas aquosas, das quais a iodopovidona é a mais usada, contêm iodo misturado com um agente solubilizante que permite a libertação de iodo livre, quando em solução. O iodo atua como antisséptico ao destruir as proteínas e o ADN dos microrganismos (Digison, 2007). Os produtos contendo iodóforos têm um largo espectro de ação antimicrobiana, eficácia e segurança em quase todas as superfícies cutâneas. Na sua forma aquosa, a maioria destes produtos iodóforos disponíveis necessita de uma aplicação em dois passos numa técnica denominada de lavagem e pintura (*scrub-and-paint*) sendo a sua atividade limitada pelo tempo de contacto com a pele (Digison, 2007).

Já o gluconato de clorexidina atua promovendo a lise da membrana celular das bactéria, tendo uma atividade antimicrobiana mais imediata e persistente (residual) e uma maior resistência à neutralização pelos produtos sanguíneos do que os iodóforos (Hibbard, 2005). O modo de aplicação é semelhante ao da iodopovidona, não podendo, no entanto, ser utilizado na região genital. O uso deste agente tem aumentado substancialmente, não só para assepsia das mãos e no duche antisséptico prévio em cirurgia humana, mas também como agente antisséptico da pele no período pré-operatório (Hibbard, 2005).

Por sua vez, os álcoois ou agentes à base de álcool, apesar de apresentarem uma excelente ação antimicrobiana imediata, têm pouco efeito residual (Paulson, 2003). Assim, quando usados sozinhos, têm uma atividade de largo espectro, são económicos, mas apresentam um período de ação reduzido (Mangram *et al.*, 1999). A vantagem do álcool face às soluções aquosas é o facto de este secar na pele exposta, podendo ser aplicado num único passo, em vez de ser necessário recorrer às técnicas de lavagem e pintura. Porém, apresenta a grande limitação de ser de inflamável (Hemani & Lepor, 2009). Atualmente, muitos produtos incorporam álcool com outro agente antisséptico, como o gluconato de clorexidina ou a iodopovidona, de modo a aumentar o efeito residual do produto conjugado, após evaporação do álcool. (Seal & Paul-Cheadle, 2004).

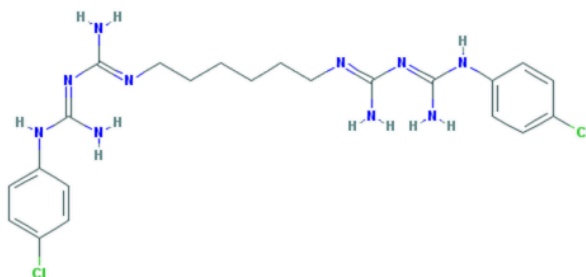
3.1 Clorexidina

A clorexidina é provavelmente o biocida mais utilizado globalmente em produtos antissépticos, particularmente para limpeza das mãos e higiene oral, mas também, em desinfetantes e preservantes. O seu uso está disseminado em vários sectores, desde a saúde, agricultura e indústria alimentar (Condell *et al.*, 2014). Isto deve-se à sua atividade de largo espectro, afinidade para a pele e fraco poder irritativo (McDonnell & Russell, 1999). Em ambiente hospitalar, o seu uso generalizou-se após a descoberta da sua grande eficácia em feridas infetadas com streptococci β -hemolíticos, e desde então, tem sido usada globalmente em vários produtos, incluindo produtos para assepsia das mãos, tratamento tópico de feridas infetadas e produtos de higiene oral para prevenção de doença periodontal (Gilbert & Moore, 2005).

3.1.1 Classificação química

A molécula de clorexidina, 1,1' – hexametileno *bis* (5-[4 – clorofenil] biguanida), é constituída por duas estruturas simétricas com quatro anéis de clorofenil e dois grupos biguanidilos unidos por uma ponte central de hexametileno (Figura 3). A sua ação biológica deve-se aos átomos de cloro unidos aos anéis fenólicos, formando os anéis clorofenólicos (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

Figura 3 – Molécula de Clorexidina (PubChem CID:9552079)



A clorexidina, cuja fórmula química é $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$, é uma molécula catiónica biocida pertencente à classe das biguanidas, apresentando um largo espectro de ação. É eficaz contra bactérias gram-negativas e gram-positivas, assim como contra leveduras, protozoários e alguns vírus lipofílicos (Condell *et al.*, 2014). É uma base fortemente alcalina, praticamente insolúvel em água, ao contrário dos seus sais di-acetado de clorexidina, di-gluconato de clorexidina e di-hidrocloridrato de clorexidina, que são solúveis em água (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). Os sais de clorexidina são bacteriostáticos em baixas concentrações e bactericidas em altas concentrações, não sendo contudo esporicidas ou micobactericidas (Fitzgerald, Davies, & Russell, 1989).

O gluconato é o composto mais utilizado com desinfetante (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). É um líquido praticamente incolor, altamente solúvel em água, correspondendo a uma solução aquosa que contém 1,1 – hexano – 1,6 diil]bis[5-(4-clorofenil) biguanida] di-D-gluconato, com a fórmula química $C_{34}H_{54}Cl_2N_{10}O_{14}$. Já o acetato de clorexidina corresponde a um pó branco microcristalino pouco solúvel em água, mas solúvel em álcool a 96%. O hidrocloridrato de clorexidina é ainda menos solúvel em água e pouco solúvel em álcool a 96% (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

As soluções aquosas de clorexidina são relativamente resistentes a temperaturas elevadas, podendo ser aquecidas até aos 100°C sem alterações das propriedades (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

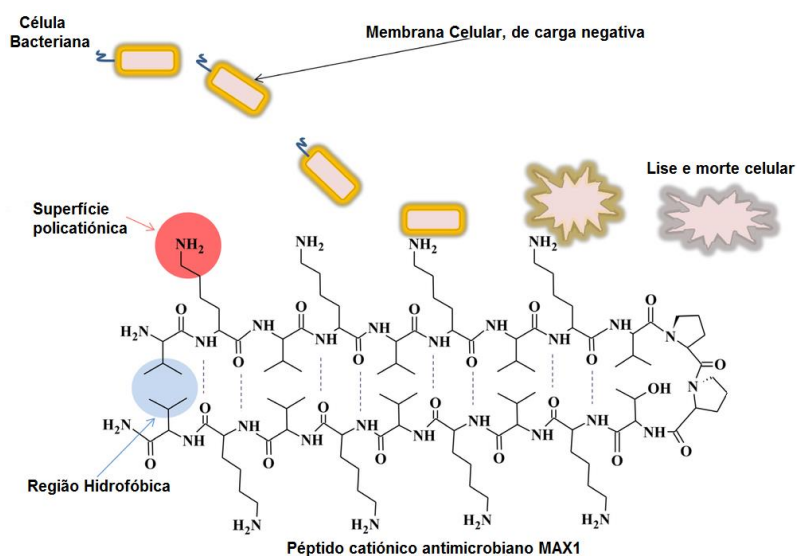
A atividade da clorexidina está dependente do pH do ambiente, variando o pH ótimo de atuação entre os 5,5 e os 7,0. A sua atividade diminui na presença de soro, sangue, exsudado e excreções, assim como na presença de sabões e de outros componentes aniônicos. Quando armazenada durante muito tempo, escurece devido à ação da luz e do ar (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; McDonnell & Russell, 1999).

3.1.2 Modo de ação

A superfície mais externa das células bacterianas apresenta universalmente uma carga negativa, muitas vezes estabilizada pela presença de catiões bivalentes, como o magnésio (Mg^{2+}) e o cálcio (Ca^{2+}). Esta carga negativa, associada à presença de ácido teicóico e elementos polissacáridos na parede celular, nas bactérias gram-positivas e à presença de

LPS nas bactérias gram-negativas, justifica o facto de muitos agentes antimicrobianos serem moléculas catiónicas, ou seja, carregados positivamente e, portanto, com alta afinidade para as células bacterianas. Os antimicrobianos catiónicos, apresentam uma carga fortemente positiva juntamente com uma região hidrofóbica o que permite a sua interação com a superfície celular e a entrada através da membrana citoplasmática. Esta integração ao nível da membrana é suficiente para perturbar o desenvolvimento bacteriano e, em níveis terapêuticos, conduzir à perda de fluidez da membrana com conseqüente morte da célula (Gilbert & Moore, 2005) (Figura 4). A clorexidina é uma molécula catiónica, cujo local primário de atuação é ao nível da membrana citoplasmática, conduzindo à modificação da sua permeabilidade através da interação electroestática inespecífica com os fosfolípidos da membrana de carga negativa (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; Maris, 1995).

Figura 4 – Mecanismo de ação antimicrobiana do péptido MAX1, um exemplo de molécula catiónica (adaptado de McCloskey, Gilmore, & Laverty, 2014)



O efeito antimicrobiano da clorexidina é caracteristicamente dose-dependente, sendo a sua atividade bacteriostática em concentrações baixas (0,02% a 0,06%) e bactericida em concentrações altas (>0,12%) (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). Em contacto com as camadas externas da célula, provoca lesões que são, ainda assim, insuficientes para conduzir à lise e morte celular. A clorexidina penetra a parede celular ou a membrana celular por um mecanismo de difusão passiva, atuando ao nível da membrana citoplasmática ou do citoplasma (McDonnell & Russell, 1999). Em baixas concentrações, afeta o balanço osmótico das células bacterianas, conduzindo à libertação de potássio, fósforo e outras moléculas de baixo peso molecular. Este efeito é reversível se o agente for removido. Já em concentrações elevadas, provoca a morte por lise celular ao promover numa fase inicial a libertação da maioria dos componentes intracelulares, incluindo os nucleótidos; estimulando a ocorrência

de alterações na estrutura das proteínas celulares e levando à precipitação das proteínas citoplasmáticas com consequente gelificação do citoplasma e redução da libertação dos constituintes intracitoplasmáticos. Assim, a clorexidina apresenta um efeito bifásico ao nível da permeabilidade da membrana. Inicialmente, há um aumento da permeabilidade, com o aumento da perda dos constituintes intracitoplasmáticos, mas, à medida que aumenta a concentração do biocida, a perda dos constituintes citoplasmáticos diminui devido à gelificação do citoplasma. Quando em concentrações elevadas, o efeito bactericida é bastante rápido devido à precipitação das proteínas citoplasmáticas, não sendo a libertação dos constituintes intracelulares a causa principal da morte celular, como se verifica em baixas concentrações (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015; Maris, 1995; McDonnell & Russell, 1999). O efeito bactericida da clorexidina é bastante rápido, tendo sido demonstrado que o seu efeito máximo em bactérias e leveduras ocorre dentro de 20 segundos após aplicação. Em leveduras, o efeito da clorexidina é semelhante ao descrito para bactérias, verificando-se o mesmo efeito bifásico na lise do protoplasto e redução da lise em concentrações elevadas (McDonnell & Russell, 1999).

3.1.3 Atividade antimicrobiana

A clorexidina é um biocida de largo espectro de ação contra bactérias, sendo mais eficaz contra bactérias gram-positivas do que contra bactérias gram-negativas, fungos e vírus. Não apresenta efeito letal para organismos álcool-ácido resistentes, verificando-se ainda que algumas bactérias, como *Proteus* e *Providencia*, são altamente resistentes. À temperatura ambiente, não tem efeito esporicida, mesmo quando aplicada em concentrações elevadas, não afetando assim a viabilidade dos esporos de *Bacillus*. No entanto, em temperaturas elevadas apresenta um efeito esporicida marcado, presumivelmente por alterações na estrutura dos esporos que permitem a maior captação de biguanidas. Em estudos *ex vivo*, a clorexidina tem-se mostrado eficaz contra *Actinomyces israelii* e *Enterococcus faecalis* presentes na raiz de dentes infetados, apresentando também uma ação eficaz contra as bactérias anaeróbias patogénicas do periodonto, incluindo *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Os agentes antissépticos que contém gluconato de clorexidina são ainda eficazes contra *Propionibacterium*, *Selenomonas* e *Serratia marcescens* (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

A clorexidina apresenta também atividade bacteriostática contra outros microrganismos, tais como *Staphylococcus aureus* suscetíveis à metilina (MSSA), MRSA, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Aspergillus spp.*, quando aplicada nas suas concentrações mínimas inibitórias (CMI) (Tabela 4) (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

Tabela 4 – Atividade bacteriostática da clorexidina contra vários microrganismos (adaptado de Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015)

Microrganismo	CMI de clorexidina (µg/mL)
MSSA	0,25 – 8
MRSA	2 – 8
<i>Enterococcus faecalis</i>	4 – 16
<i>Streptococcus mutans</i>	0,9 – 4
<i>Lactobacillus reuteri</i>	0,125 – 4
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,25 – 1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,5 – 2
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	0,9
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1,8
<i>Escherichia coli</i>	2 – 16
<i>Klebsiella</i> spp.	8 – 16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16 – 32
<i>Candida albicans</i>	1 – 16
<i>Candida tropicalis</i>	75
<i>Candida krusei</i>	150
<i>Aspergillus</i> spp.	8 – 64

Foi observada uma correlação entre a sensibilidade dos microrganismos a antibióticos e a suscetibilidade à clorexidina, sendo que bactérias gram-negativas resistentes a antibióticos como ciprofloxacina, imipenem, cefotaxima, ceftazidima, aztreonam e gentamicina apresentam maiores níveis de resistência à clorexidina (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015). Ainda assim, como antisséptico, esta apresenta uma atividade comparável quer para as estirpes de MSSA quer para as estirpes de MRSA e o mesmo se verifica para as estirpes de enterococci suscetíveis à Vancomicina (VSE) e resistentes (VRE) (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

Este biocida tem ainda atividade contra dermatófitos e leveduras. De facto, quando presente em concentrações bacteriostáticas ou bactericidas, a sensibilidade de espécies de *Candida* é semelhante (ex: *Candida albicans*) ou superior (ex: *C. tropicalis*, *C. krusei*) à sensibilidade das células vegetativas bacterianas, afetando a sua patogenicidade através da inibição da gemulação (provavelmente através de uma inibição enzimática) e da redução da adesão às células epiteliais (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

Quanto aos vírus, os vírus lipofílicos, tais como herpesvírus, vírus da imunodeficiência humana e o vírus influenza, são rapidamente inativados pela ação da clorexidina pela sua

interação com o envelope lipídico, enquanto que os vírus sem envelope, como enterovírus, poliovírus e papilomavírus, são mais resistentes (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

3.1.4 Aplicações

A clorexidina é bastante eficaz como antisséptico pré-cirúrgico, quer para assepsia das mãos quer na preparação da pele do doente, estando associada a rácios de infeções do local cirúrgico mais baixos. Em dentística, este biocida é amplamente utilizado em formulações *spray*, géis, resinas dentárias, pastas e elixires dentífricos, encontrando-se igualmente disponível sobre a forma de aerossol para aplicação nasal (Karpiński & Szkaradkiewicz, 2015).

3.2 Iodóforos: Iodopovidona

Os iodóforos são utilizados frequentemente para todas as especialidades médicas para a assepsia da pele previamente a procedimentos invasivos, incluindo injeções e cirurgias (Capriotti & Capriotti, 2012). Das soluções iodóforas aquosas disponíveis, a iodopovidona é a mais amplamente usada. Esta solução contém iodo misturado com um agente solubilizante, que permite a libertação de iodo livre quando em solução (Digison, 2007; Mizukami, Y & Yokoyama, 1993).

O iodo é um dos halogéneos mais utilizados na prática clínica devido à combinação da sua baixa toxicidade com a facilidade com que reage com moléculas orgânicas. Como os demais halogéneos, a sua eletronegatividade relativamente elevada previne a sua ocorrência na natureza exceto na forma de complexos orgânicos iodados. É um agente oxidante muito forte, que rapidamente arranca eletrões de elementos menos eletronegativos (Capriotti & Capriotti, 2012).

O efeito antisséptico do iodo foi rapidamente reconhecido após a sua descoberta, porém o seu uso foi limitado pela baixa solubilidade aquosa, baixa estabilidade química e pela elevada toxicidade local (Capriotti & Capriotti, 2012). A solução de Lugol, ao combinar o iodo elementar com sais de potássio iodado, altera o equilíbrio de distribuição das espécies iodadas aquosas de modo a facilitar a solubilização do triiodo, promovendo a sua estabilidade química. A solubilidade do iodo é também mais elevada nas tinturas de iodo, os quais, para além de conterem potássio iodado em concentração inferior à da solução de lugol, contêm álcool a 70%, conferindo assim um maior poder de solubilização (Capriotti & Capriotti, 2012).

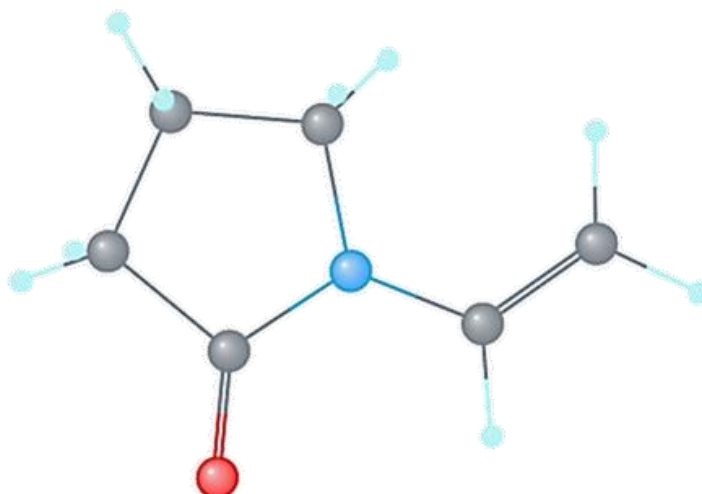
As soluções aquosas ou alcoólicas de iodo estão, no entanto, associadas a uma irritação cutânea e coloração da pele pelo que a sua utilização foi decaindo até à década de 1950, quando ocorreu a introdução no mercado do composto hidrossolúvel iodopovidona (Durani & Leaper, 2008).

3.2.1 Classificação química

A utilização de iodopovidona foi descrita pela primeira vez em 1952 por Shalanski. Esta solução, ao combinar um complexo de triiodo com um polímero orgânico solúvel, a polivinilpirrolidona (Figura 5), resolveu o problema da baixa solubilidade, da baixa estabilidade química e da alta toxicidade local do iodo livre, permitindo utilizar assim com segurança as concentrações mais elevadas e mais eficazes (Capriotti & Capriotti, 2012).

A iodopovidona (PubChem CID:410087), cuja fórmula molecular é $C_6H_9I_2NO$, é um pó higroscópico amargo amarelo-acastanhado com um ligeiro odor característico. É solúvel em água, álcool e praticamente insolúvel em clorofórmio, carbono tetracloreto, éter, solvente hexano, acetona e petróleo. A solução aquosa apresenta um pH a rondar o valor de 2, podendo ser mais neutralizada ao adicionar bicarbonato de sódio, o que a torna contudo menos estável (National Center for Biotechnology Information, n.d.-b).

Figura 5 – Molécula de polivinilpirrolidona (PubChem CID:410087)



Numa solução aquosa, a reação entre a iodopovidona e a água conduz à formação de sete formas iodadas, das quais apenas o iodo molecular (I_2), o ácido hipoiodoso (HIO) e o iodo catiónico (H_2O+I) têm efeito bactericida. Assim, o iodo molecular livre corresponde à componente bactericida, dependendo, no entanto, o seu efeito da concentração da solução de iodopovidona. Por sua vez, a polivinilpirrolidona não apresenta qualquer efeito bactericida, mas apresenta afinidade para as membranas celulares permitindo que a preparação iodófora atinja o local alvo (Capriotti & Capriotti, 2012).

3.2.2 Modo de ação

Tal como referido anteriormente, a atividade microbicida da iodopovidona é quase totalmente devido ao iodo molecular. As complicações associadas à toxicidade do uso de iodo livre, como irritação e queimaduras de pele, são assim evitadas através da utilização do complexo iodopovidona. A maioria dos produtos com iodopovidona utilizados nas medicinas são soluções que contêm entre 0,5 a 1,0 % de iodo molecular livre, como é o caso do “Betadine®” a 10%, a solução aquosa mais utilizada pré-cirurgicamente e que contém cerca de 1% iodo molecular livre (Capriotti & Capriotti, 2012; Durani & Leaper, 2008).

A ação bactericida do iodo molecular livre segue a distribuição de uma curva de Gauss, tendo um comportamento paradoxal. Considerando uma solução a 10%, a quantidade de iodo livre aumenta à medida que esta é diluída, atingindo um valor máximo numa solução a 0,1% [diluição 1:100]. A partir deste valor, o iodo livre diminui com o aumento das diluições. Consequentemente, observa-se um aumento da atividade microbicida à medida que a diluição aumenta, e uma diminuição da capacidade germicida a partir de diluições superiores a 1:100 (Durani & Leaper, 2008; Rackur, 1985).

Apesar do mecanismo de ação não estar totalmente compreendido, pensa-se que o iodo interfere com o transporte de eletrões, inibe a respiração celular, destabiliza as membranas, inibe a síntese proteica e promove a desnaturação dos ácidos nucleicos (Capriotti & Capriotti, 2012). Também ao bloquear o transporte de eletrões através de interações eletrofilicas com as enzimas da cadeia respiratória, o iodo tem a capacidade de diminuir a disponibilidade de oxigénio para os microrganismos aeróbios. Para além disso, tem a capacidade de penetrar a parede celular dos microrganismos levando à destruição da estrutura das proteínas e ácidos nucleicos (Rutala, Weber, & HICPAC, 2008). De facto, este agente penetra rapidamente nos microrganismos, atacando grupos chave de proteínas, particularmente os aminoácidos metionina e cisteína, nucleótidos e ácidos gordos, levando a morte celular (Capriotti & Capriotti, 2012). O mecanismo de ação contra vírus é ainda menos conhecido (McDonnell & Russell, 1999).

3.2.3 Atividade antimicrobiana

O iodo é um biocida de largo espectro de ação e sem resistências conhecidas (Capriotti & Capriotti, 2012). A sua ação microbicida resulta da presença de iodo elementar livre, que tem a capacidade de penetrar nas células e atuar através de diversos mecanismos para eliminar os microrganismos de uma maneira inespecífica (Capriotti & Capriotti, 2012).

Este biocida tem um excelente efeito antimicrobiano imediato, sendo eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos, protozoários e vírus. No tempo de exposição e na concentração recomendados, os iodóforos são eficazes contra *Mycobacterium* e esporos de *Bacillus* spp. e *Clostridium* spp. Porém, a sua eficácia é diminuída na presença de sangue,

tecido necrótico e/ou exsudado. O iodo tem efeito bactericida, fungicida, micobactericida, virucida e esporicida rápidos. Porém, os iodóforos disponíveis comercialmente, apesar de manterem quase todas as propriedades do iodo, não parecem apresentar o mesmo efeito esporicida (Dumville *et al.*, 2015; McDonnell & Russell, 1999; Paulson, 2003; Rutala *et al.*, 2008).

Do ponto de vista dermatológico, o iodo tem ainda a capacidade de erradicar organismos como *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Candida*, *Trichophyton* e micobactérias (Capriotti & Capriotti, 2012).

A sua atuação contra vírus é pouco conhecida, verificando-se que vírus sem envelope e parvovírus são menos sensíveis do que vírus com envelope. É provável que, tal como ocorre nas bactérias, o iodo ataque as proteínas superficiais dos vírus com envelope, podendo também destabilizar os ácidos gordos da membrana ao reagir com as pontes de carbono insaturadas presentes na sua estrutura (McDonnell & Russell, 1999).

3.2.4 Aplicações

Em concentrações reduzidas, a iodopovidona é um excelente agente antimicrobiano, utilizado não só como desinfetante, mas também como agente tópico terapêutico, dependendo da concentração e modo de utilização. Atualmente existem diversos produtos aprovados pela FDA que contêm iodopovidona e, apesar de a iodopovidona a 10% se manter a escolha de eleição para aplicação em assepsia pré-cirúrgica, concentrações menores são utilizadas com outros objetivos. Em oftalmologia, antes da execução da maioria dos procedimentos mais invasivos, incluindo cirurgia, paracenteses da câmara anterior e injeções intra-vitreas, a formulação mais utilizada é iodopovidona a 5%. Soluções mais diluídas, abaixo dos 2%, são bastante úteis como agente profilático e terapêutico nas conjuntivites juvenis e, abaixo dos 0,4%, são utilizadas no tratamento de conjuntivites virais, como adenovirose, provando a consistência *in vivo* do efeito paradoxal deste agente (Capriotti & Capriotti, 2012; Rutala *et al.*, 2008).

No tratamento de otites (médias e externas) várias formulações de diversas concentrações de iodopovidona têm-se revelado seguras e eficazes, mesmo em casos de otomicoses crônicas (Capriotti & Capriotti, 2012). Por fim, a iodopovidona tem ainda aplicação na prevenção de infeções respiratórias, sinusites e infeções intraoperatórias (Capriotti & Capriotti, 2012).

3.3 Álcoois e agentes à base de Álcool

De acordo com a FDA, os álcoois são os biocidas mais eficazes, de ação mais rápida, e com um largo espectro de ação (Mangram *et al.*, 1999). Estes biocidas contêm álcool etílico de 60% a 95% por volume em solução aquosa ou álcool isopropílico de 50% a 91,3% por volume em solução aquosa (Mangram *et al.*, 1999). Ainda assim, não existe nenhum produto líquido que contenha um álcool como o agente ativo principal (Rutala *et al.*, 2008). Devido ao seu fraco poder residual, o álcool é geralmente utilizado conjuntamente com outros agentes biocidas como iodóforos, clorexidina, pirotiona de zinco ou agentes semelhantes, de modo a prolongar o seu efeito antimicrobiano (Seal & Paul-Cheadle, 2004).

3.3.1 Classificação Química

Apesar de vários álcoois serem antimicrobianos compostos eficazes, os mais utilizados são o álcool etílico (etanol) e o álcool isopropílico (isopropanolol) (Mangram *et al.*, 1999). O álcool etílico (PubChem CID:702), cuja fórmula molecular é $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, corresponde a um líquido volátil, límpido e incolor resultante da fermentação de certos hidratos de carbonos (National Center for Biotechnology Information, n.d.-c).

O álcool isopropílico (PubChem CID:3776), cuja fórmula molecular é $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$, corresponde a um líquido incolor com propriedades desinfetantes (National Center for Biotechnology Information, n.d.-a).

3.3.2 Modo de Ação

Embora o mecanismo específico de ação dos álcoois não se encontre completamente esclarecido, uma vez que a sua eficácia aumenta na presença de água, é provável que atuem através da destruição da membrana e da desnaturação das proteínas, com consequente alteração metabólica e lise celular (Mangram *et al.*, 1999). A rápida desnaturação proteica constitui o mecanismo principal da ação destes agentes (Rutala *et al.*, 2008). O seu efeito bacteriostático baseia-se na inibição da produção de certos metabolitos essenciais para a rápida divisão celular (Rutala *et al.*, 2008).

O álcool etílico (PubChem CID:702) atua como bactericida, desinfetante, diurético e depressor do sistema nervoso central (SNC) se consumido, ao actuar como agonista para os recetores do neurotransmissor inibitório aminoácido gama-butírico (GABA). O efeito diurético deve-se à capacidade de inibição da produção da hormona antidiurética, o que promove o aumento da diurese e consequente desidratação (National Center for Biotechnology Information, n.d.-c).

O álcool isopropílico (PubChem CID:3776) tem também um mecanismo de ação complexo e mal conhecido, podendo conduzir à morte celular pela desnaturação das proteínas e ADN celular, o que vai interferir com o metabolismo celular promovendo a disrupção das

membranas celulares lipoproteicas. É também utilizado topicamente como agente antisséptico (National Center for Biotechnology Information, n.d.-a).

3.3.3 Atividade antimicrobiana

Os álcoois são bactericidas eficazes, atuando contra bactérias na sua forma vegetativa (incluindo micobactérias) e também contra fungos e vírus, sendo, no entanto, ineficazes contra esporos bacterianos. Estes agentes inibem a esporulação e a germinação de esporos, mas de modo reversível, não tendo, portanto, um efeito esporicida. O seu efeito antimicrobiano é imediato mas de curta duração, ou seja, apresentam um efeito residual curto (McDonnell & Russell, 1999; Paulson, 2003).

O álcool isopropílico é mais eficaz contra bactérias do que o álcool etílico, sendo este mais eficaz contra vírus. Ainda assim, o efeito de ambos depende da concentração do agente e do microrganismo a eliminar (McDonnell & Russell, 1999). O seu efeito bactericida decai substancialmente quando diluídos abaixo dos 50%, observando-se uma atividade bactericida ótima em soluções aquosas com concentrações entre 60% e 90% (Rutala *et al.*, 2008).

Em 1950, Harry Morton avaliou a atividade bactericida do álcool etílico em diversas concentrações para vários microrganismos em intervalos de tempo de exposição entre 10 segundos a 1 hora. Neste estudo, para um tempo de exposição de 10 segundos, este agente foi eficaz contra *Pseudomonas* em concentrações de 30 a 100%; contra *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* e *Salmonella typhosa* em concentrações de 40 a 100%; e ainda contra os organismos gram-positivos *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pyogenes* (apesar de mais resistentes) em concentrações de 60 a 95% (Morton, 1950). Este mesmo agente, para um tempo de exposição de 15 segundos, demonstrou-se eficaz contra *Mycobacterium tuberculosis* em solução aquosa com a concentração de 95%, sendo também um potente virucida em concentrações de 60 a 80%, inativando todos os vírus lipofílicos, como herpesvírus, vírus da varíola, vírus influenza, e diversos vírus hidrofílicos como adenovírus, enterovírus, rinovírus e rotavírus. Tem ainda capacidade de inativar o vírus da imunodeficiência humana adquirida, rotavírus, ecovírus e astrovírus (Morton, 1950). O álcool etílico a 70% foi a concentração mais eficaz contra as fases tecidulares de *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* e *Histoplasma capsulatum* e contra as fases de cultura dos três últimos microrganismos aerossolizados em várias superfícies (Morton, 1950). Por sua vez, o álcool isopropílico a 20% é eficaz contra os quistos de *Acanthamoeba culbertsoni*; mas não contra enterovírus não lipídicos (Rutala *et al.*, 2008).

3.3.4 Aplicações

Devido à sua fraca atividade esporicida, estes agentes não são recomendados para esterilização de superfícies, sendo porém utilizados para a desinfecção de superfícies e assepsia da pele (McDonnell & Russell, 1999). As soluções alcoólicas não devem ser aplicadas em membranas mucosas, sendo a sua utilidade reduzida como antissépticos antes de cirurgias transuretrais ou transvaginais (Hemani & Lepor, 2009). Em geral, a atividade antimicrobiana dos álcoois é baixa em concentrações inferiores a 50%, e ótima em concentrações entre os 60% e os 90% (McDonnell & Russell, 1999). Concentrações mais baixas são utilizadas como preservantes e potenciadores de atividade de outros biocidas. Muitos produtos à base de álcool contêm também outros biocidas em concentrações baixas, que permanecem na pele após a evaporação do álcool, ou então excipientes que atrasam a evaporação do álcool, aumentando assim a eficácia do produto (McDonnell & Russell, 1999). A combinação do álcool com o gluconato de clorexidina permite acumular o efeito antimicrobiano imediato do álcool ao efeito de persistência (residual) da clorexidina, apresentando uma eficácia clínica superior como antisséptico de pele (Paulson, 2003). Do mesmo modo, a junção do álcool isopropílico com um iodóforo permite obter um produto com eficácia imediata que requer um menor tempo de aplicação em comparação com os iodóforos de modo individual (Segal & Anderson, 2002).

Os agentes à base de álcool têm sido utilizados em ambiente hospitalar para desinfecção de materiais utilizados na prática clínica diária, como por exemplo termômetros, tesouras e estetoscópios (Rutala *et al.*, 2008).

3.4 Resistência aos Biocidas

Uma vez que a disseminação de bactérias potencialmente patogênicas resistentes a antibióticos têm vindo a aumentar a nível mundial, conduzindo a falhas terapêuticas quer em medicina humana quer em medicina veterinária, e que as bactérias têm a capacidade de se adaptar rapidamente a novas condições ambientais, como a presença de moléculas antimicrobianas, os agentes antissépticos devem ser utilizados cuidadosamente, de modo a impedir a perda do seu poder antimicrobiano (SCENIHR, 2009).

Desde a década de 50 do séc. XX, têm sido reportados casos de isolamento de bactérias resistentes a biocidas, particularmente a partir de produtos catiónicos contaminados e de falhas de manipulação ou de armazenamento. Encontram-se também disponíveis relatos de bactérias resistentes a biocidas em ambiente hospitalar, incluindo a compostos como a clorexidina, compostos quaternários de amónio, bisfenóis, triclosan, iodóforos, parabenos, glutaraldeído e peróxidos. Apesar dos biocidas serem eficazes contra bactérias com perfil de resistência a antibióticos, incluindo MRSA e *Pseudomonas aeruginosa*, alguns produtos utilizados em meio hospitalar têm-se mostrado ineficientes contra agentes patogênicos nosocomiais que crescem sob a forma de biofilmes em superfícies. Uma vez que o interesse

no estudo de bactérias com resistências emergentes a diferentes tipos de biocidas é relativamente recente, as evidências científicas que relacionam a aplicação de biocidas com o desenvolvimento de resistências a antibióticos são limitadas e ainda controversas (SCENIHR, 2009). No entanto, encontra-se demonstrado que certos mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos e aos biocidas são comuns, como por exemplo, a presença de bombas de efluxo, alterações da permeabilidade e a formação de biofilmes (SCENIHR, 2009).

A resistência aos biocidas de atuação na membrana passa por alterações ao nível da composição da membrana citoplasmática, como o descrito para *Pseudomonas aeruginosa*, conferindo resistência a compostos quaternários de amónio e dificultando a penetração do agente biocida através da membrana. Alterações na composição da membrana citoplasmática foram também associadas à resistência à clorexidina em *Serratia marcesens* e *Providencia stuartii* (Chapman, 2003).

A produção de enzimas com a capacidade de destruir a molécula do biocida constitui outro dos mecanismos descritos. A resistência a ésteres, como os ésteres do ácido parahidroxibenzoico, é atribuída à hidrólise deste composto por meio das esterases, como foi observado no caso de *Burkholderia cepacia* e de *Enterobacter cloacae* (Chapman, 2003).

Um outro mecanismo de resistência é a presença de bombas de efluxo, as quais têm a capacidade de diminuir a concentração intracelular de componentes tóxicos, incluindo os biocidas, contribuindo para diminuir a eficácia dos vários agentes antissépticos incluindo os compostos quaternários, os parabenos e os fenóis. Este mecanismo de resistência encontra-se descrito no caso de *Staphylococcus aureus* e de bactérias gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (SCENIHR, 2009).

Encontra-se também descrita a presença de genes que conferem resistência a estes compostos antimicrobianos, podendo também conferir o aparecimento de resistências cruzadas. A exposição a baixas concentrações de biocidas pode também promover a transferência de determinantes genéticas de resistência ou induzir a sobreexpressão de genes que codificam para as bombas de efluxo e para a produção de guanosina 5'-difosfato 3'-difosfato (SCENIHR, 2009).

Relativamente aos biocidas oxidantes e aos eletrófilos menos reativos, a multiplicidade de alvos destes grupos torna difícil o desenvolvimento de mecanismos que confirmam resistência, sendo esta conseguida apenas através da inativação do biocida ou dos seus derivados tóxicos ou através do bloqueio do acesso aos alvos destes agentes (Chapman, 2003).

Assim, para preservar o papel dos biocidas no controlo de infeções e higiene, é essencial prevenir a emergência de bactérias resistentes a estes compostos, bem como de resistências cruzadas, promovendo o uso apropriado destes compostos antimicrobianos (SCENIHR, 2009).

4. PROTOCOLO DE ASSEPSIA CIRÚRGICA

Um dos objetivos primários da assepsia cirúrgica é obter uma baixa incidência de infecções do local cirúrgico. Para atingir este fim, é essencial adotar uma série de comportamentos básicos no bloco operatório, proceder à escolha e preparação adequadas dos doentes e da equipa cirúrgica, e realizar a manutenção adequada de todas as salas de cirurgia (Renberg, 2011).

Os protocolos de assepsia consistem na utilização de antissépticos e/ou dispositivos com o objetivo de alcançar a condição de assepsia, ou seja, a ausência de agentes patogénicos vivos. Quando aplicados a tecidos vivos, os agentes designam-se como antissépticos, enquanto que, o termo desinfetante é utilizado para compostos aplicados a superfícies inanimadas (Renberg, 2011).

A preparação do local cirúrgico envolve uma série de etapas que incluem a tricotomia e a limpeza da região a ser intervencionada, objetivando a remoção de microrganismos transientes e a redução quantitativa da microbiota residente (Renberg, 2011). A tricotomia em redor do local cirúrgico deve ser realizada com uma tosquiadora e imediatamente antes do procedimento cirúrgico, estando este modo associado à redução de incidência de infeção (World Health Organization, 2016).

Apesar de, na maioria dos centros de medicina veterinária, a tricotomia do local cirúrgico ser a primeira etapa realizada na preparação do doente, nalguns casos deveria considerar-se a execução de um banho prévio, cujo objetivo principal é a eliminação da microbiota transiente da pele (Renberg, 2011). De acordo com a OMS (2016), este procedimento constitui uma boa prática, devendo-se utilizar um sabão normal ou com antimicrobiano (World Health Organization, 2016). Em medicina veterinária este ponto é ainda controverso, mas alguns estudos demonstram uma redução na quantificação microbiana e uma presença residual de antisséptico quando se recorre ao banho prévio. Ainda assim, a vantagem desta redução deve ser avaliada tendo em conta a necessidade de ter um doente seco ou a possibilidade de secar a pele, procedimento que pode provocar inflamação (Renberg, 2011).

As técnicas de assepsia pré-cirúrgica mais utilizadas incluem a utilização de soluções de clorexidina ou à base de iodo alternadas com álcool, como preparação não esterilizante na zona de preparatório, seguindo-se um procedimento esterilizante. Assim, estas técnicas pretendem eliminar a microbiota transiente e suprimir a microbiota residente que não se consiga eliminar. De facto, cerca de 20% da microbiota da pele permanece protegida em estratos mais profundos e nos folículos, independentemente do protocolo adotado (Renberg, 2011).

Em relação ao agente antisséptico utilizado, alguns estudos comparativos têm sido realizados entre produtos à base de clorexidina e produtos à base de iodopovidona, quer em medicina humana quer em medicina veterinária. Em medicina humana, a OMS recomenda o uso de soluções alcoólicas à base de gluconato de clorexidina para a assepsia de pele de doentes

submetidos a cirurgia (World Health Organization, 2016). Porém, em medicina veterinária ainda não foi possível demonstrar que o uso de um destes biocidas em detrimento do outro apresenta impacto significativo nas contagens bacterianas (Gibson *et al.*, 1997; Osuna *et al.*, 1990; Renberg, 2011).

A aplicação de algumas soluções necessita do uso de compressas esterilizadas, sendo estas esterilizadas em pacotes juntamente com taças onde os antissépticos são posteriormente colocados. Soluções mais recentes já incluem um aplicador, pelo que a sua aplicação não exige a utilização de compressas esterilizadas (Fossum, 2012). Normalmente, seguindo-se os princípios básicos das técnicas assépticas de evitar a contaminação de zonas de pele limpas ao arrastar contaminantes de zonas não preparadas, recomenda-se a aplicação dos biocidas da zona mais limpa para a zona mais suja, começando a limpar com a compressa ou aplicador do centro da área a ser intervencionada (ou seja o local de incisão) e movendo-se em direção à periferia em círculos concêntricos (Anderson, Foster, & Weese, 2013).

Independentemente do agente antisséptico utilizado, o tempo de contacto com a pele antes da cirurgia é muito importante, podendo este variar desde 30 segundos para uma combinação de clorexidina com álcool, até 2 minutos, para a iodopovidona. Quando se recorre a produtos específicos, deverá seguir-se as recomendações inscritas no rótulo do mesmo (Renberg, 2011).

Apesar da alternância entre limpeza e aplicação de álcool ser um protocolo comum, o estabelecimento de técnicas de apenas uma etapa, que preconizam a utilização de um único produto aplicado uma única vez, encontra-se associado a um menor tempo necessário para a preparação pré-cirúrgica e a uma maior simplicidade da técnica (Renberg, 2011). Em 1993, Rochat demonstrou que um protocolo de apenas uma etapa, utilizando álcool isopropílico a 70% numa base iodófora, apresenta uma eficácia igual a uma técnica de duas etapas com a iodopovidona (Renberg, 2011; Rochat, Mann, & Berg, 1993).

Adicionalmente, o uso de técnicas de aplicação de *spray*, em oposição às técnicas de limpeza com compressas parece apresentar uma eficácia idêntica (Renberg, 2011).

É importante reconhecer que a morbidade e mortalidade associadas a infeções do local cirúrgico são muitas vezes evitáveis através da aplicação de medidas preventivas pré, intra e pós-cirúrgicas (Owens & Stoessel, 2008).

5. OBJETIVO DO ESTUDO

O presente estudo de dissertação de mestrado no âmbito da assepsia cirúrgica foi realizado no Hospital Escolar Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (HEV-FMV-ULisboa), no Centro de Medicina Veterinária Anjos de Assis (CMVAA) e no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-ULisboa, refletindo o interesse pessoal do autor pela área da cirurgia. Tendo em conta que, ao contrário do que se observa em medicina humana, onde existem disponíveis Normas de Orientação Clínica quanto ao melhor biocida a utilizar para a assepsia pré-cirúrgica da pele do doente a intervir, e que em medicina veterinária ainda não há um consenso nesta área, o objetivo da presente dissertação foi avaliar e comparar a eficácia de dois protocolos de assepsia pré-cirúrgica da pele utilizando clorexidina-álcool vs iodopovidona, como medida preventiva de infeções do local cirúrgico em canídeos.

Assim, os objetivos específicos do estudo foram:

- I. Avaliar e comparar a eficácia dos biocidas Iodopovidona e Gluconato de clorexidina como agentes de assepsia pré-cirúrgica da pele de canídeos sujeitos a intervenções cirúrgicas;
- II. Avaliar se a lâmina de bisturi se comporta como um fomite para a disseminação de bactérias para tecidos internos;
- III. Avaliar a presença de bactérias multirresistentes na pele dos animais intervir e a eficácia dos biocidas selecionados na sua eliminação.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Amostragem

A amostra integrada no estudo foi constituída por 46 canídeos (N=46), apresentados ao CMVAA para a realização de técnica cirúrgica ortopédica ou de tecidos moles. A distribuição das cirurgias do estudo foi feita de modo a incluir várias regiões anatómicas e a sua microbiota típica. A idade, sexo, raça e local da cirurgia não foram considerados na seleção dos doentes a incluir nesta amostragem.

Os animais em estudo apresentam uma distribuição por sexo de 17 machos e 29 fêmeas, com idades compreendidas entre os 7 meses e os 16,3 anos (média (\bar{X}) \pm desvio padrão (δ) = 6,6 \pm 4,3 anos) (Gráfico 5), e pesos entre os 1,8 kg e os 38,2 kg (mediana \pm intervalo interquartil = 15,6 \pm 13,0) (Gráfico 6).

Gráfico 5 – Distribuição em *boxplot* da idade dos animais em estudo

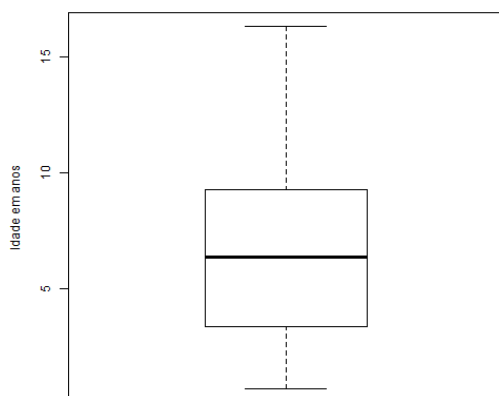
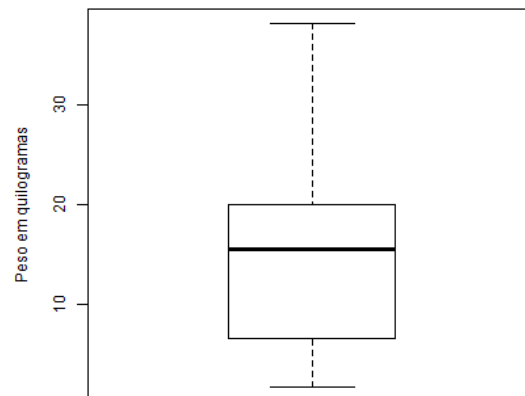


Gráfico 6 – Distribuição em *boxplot* do peso dos animais em estudo



Todos os canídeos incluídos no estudo fizeram análises pré-cirúrgicas, incluindo hemograma e bioquímicas de rotina, sendo que os que apresentaram desvios aos valores de referência foram automaticamente excluídos. Dos 46 canídeos, 23 foram selecionados aleatoriamente e de modo cego para a avaliação de um protocolo e outros 23 para o outro, de acordo com uma metodologia de seleção alternada de 1 para 1.

A partir de cada canídeo foram realizadas três amostragens por zaragatoa (VWR® transport swabs, sterile, with snappable PS + viscose, 38x210mm, Amies medium with charcoal). A primeira amostra foi recolhida previamente à assepsia (t0), a segunda pós-assepsia (t1) e a última a partir da lâmina de bisturi após incisão da pele (t2). Estas zaragatoas foram mantidas em meio de transporte, conservadas, protegidas da luz e à temperatura ambiente até processamento laboratorial no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-ULisboa.

6.2 Protocolo experimental cirúrgico

Todos os canídeos incluídos no estudo foram admitidos no CMVAA no dia da cirurgia, cumprindo as recomendadas 8 horas de jejum de sólidos e líquidos. Após avaliação do estado geral e o exame objetivo do canídeo, o doente era encaminhado para a zona de preparatório cirúrgico onde era instituída a pré-medicação anestésica, compreendendo a terapêutica analgésica, anti-inflamatória e antibioterapia adequadas ao tipo de cirurgia. Para a indução anestésica, utilizou-se propofol em emulsão lipídica a 10mg/mL (1–4 mg/kg i.v.), sendo a anestesia mantida com isoflurano em oxigênio.

Com o indivíduo já anestesiado, delimitou-se uma área de 10x10cm para a realização amostragem recorrendo a uma compressa esterilizada e procedeu-se à tricotomia e remoção de sujidade e pelos do local cirúrgico. Nesta etapa, recolhia-se a primeira amostra (t0), realizando um esfregaço de pele da área de 10x10cm, com o auxílio de uma zaragatoa.

De seguida, o biocida selecionado e colocado em embalagem não identificável era aplicado sempre pelo mesmo operador sobre a área delimitada, recorrendo a compressas estéreis 10x10cm e a luvas cirúrgicas estéreis (vasco® surgical gloves Braun). Um grupo de 23 canídeos foi submetido ao protocolo de assepsia com uma solução aquosa de iodopovidona (Braunol®), seguida da aplicação de Braunol® em *spray*, enquanto o outro grupo foi submetido a um protocolo de assepsia com uma solução alcoólica de gluconato de clorexidina (Desinclor® 2%), seguida da aplicação de álcool isopropílico a 70% em *spray* (Tabela 5). Um minuto após a aplicação do biocida, era realizado um segundo esfregaço da área (t1), tal como descrito anteriormente. Em seguida, o canídeo era transferido para o bloco operatório, onde era realizada a terceira amostragem a partir da lâmina de bisturi utilizada para fazer a incisão de abertura da pele (t2), lâmina essa descartada após a realização da amostragem.

Tabela 5 – Produtos biocidas utilizados e principais características

	Biocida	Solução	Composição (100g de solução)	Utilização	Espectro
Desinclor® 2%	Diguconato de Clorexidina	Alcoólica	70g de álcool isopropílico + 2g de digluconato de clorexidina	Assepsia da pele; Antissépsia das mãos.	Largo (batericida, fungicida, micobactericida)
Braunol®	Iodopovidona	Aquosa	7,5g iodopovidona (10% iodo disponível)	Assepsia da pele e trato urogenital; Antissépsia das mãos.	Largo (batericida, fungicida, micobactericida, inativador-viral, protozoacida)

Todos os canídeos foram reavaliados às 24h e ao 10º dia pós-cirúrgico para avaliação da sutura e identificação de infeções.

6.3 Protocolo experimental laboratorial

Após a cirurgia, as três zaragoas recolhidas a partir de cada animal eram conservadas à temperatura ambiente e protegidas da luz até transporte e processamento no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FMV-ULisboa (Anexo II).

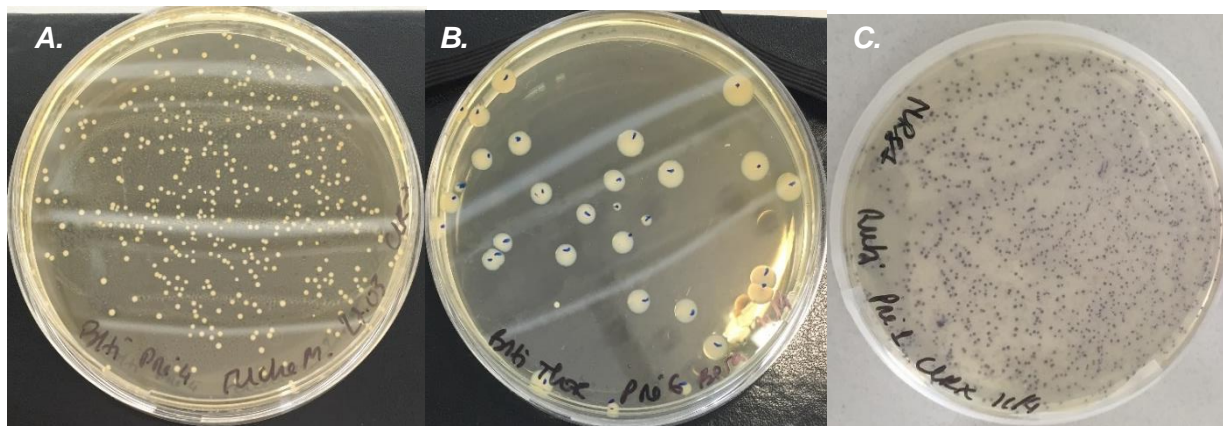
No laboratório, todas as zaragoas foram colocadas em tubos de ensaio com 1 mL de soro fisiológico estéril e homogeneizadas num *vórtex* durante cerca de 30 segundos. A partir das suspensões realizadas a partir das zaragoas recolhidas no momento pré-asepsia, foram realizadas diluições de base 10 até 10^{-5} . De cada diluição foram retirados 100 μ L e posteriormente semeados por espalhamento em meio de cultura de enriquecimento inespecífico Brain Heart Infusion agar (BHI - VWR® Brain heart infusion broth ref 84626.0500) (Anexo II). Da suspensão inicial foram semeados 100 μ L em BHI agar e em meio cromogénico seletivo e diferencial de MRSA (meio de MRSA agar cromogénico modificado, laboratórios CONDA, pronadisa® cat. Nº: 1498) (Anexo III). Este meio de MRSA agar cromogénico modificado é, de acordo com as indicações do fabricante, um meio de agar cromogénico suplementado com cefoxitina que permite o crescimento, após incubação a 35 ± 2 graus Celsius ($^{\circ}$ C) durante 24-48 horas, de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus epidermidis*, que originam colónias com cor roxa ou azul-esverdeada, respetivamente.

No caso das suspensões em soro fisiológico realizadas a partir das zaragoas de pele recolhidas nos momentos pós-asepsia e da lâmina, a sementeira era realizada nos meios BHI agar e MRSA agar cromogénico modificado, utilizando 100 μ L da suspensão inicial.

Após a elaboração e plaqueamento em câmara de fluxo laminar, estes meios foram armazenados a 4° C até utilização.

Após sementeira, as placas de BHI agar foram incubadas na estufa a 37° C durante 48h e as de MRSA a 37° C durante 72h. A quantificação das unidades formadoras de colónias em cada placa foi realizada às 24 e 48h para as sementeiras em BHI agar e também às 72h para as sementeiras em meio MRSA (Figura 6).

Figura 6 – Resultados das sementeiras realizadas durante o protocolo experimental laboratorial (original)



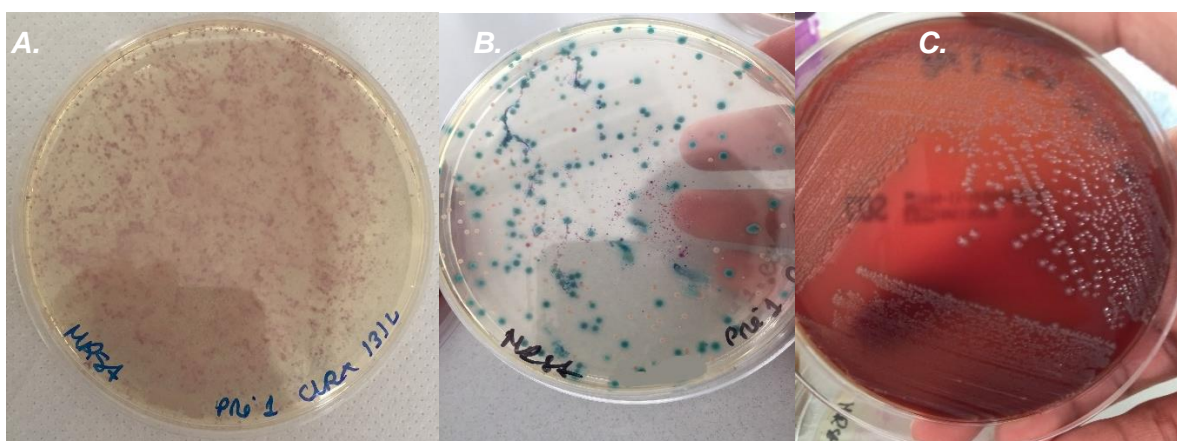
A – sementeira de uma diluição 10^{-3} de uma amostra recolhida na fase pré-asepsia, em meio BHI agar; **B** – sementeira de uma diluição 10^{-5} da amostra recolhida na fase pré-asepsia, em meio BHI agar ; **C** – sementeira de amostra recolhida na fase pré-asepsia, em meio MRSA (10^0)

A quantificação da microbiota total da pele era determinada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\boxed{\text{número de colónias} \times 10 \text{ (conversão para 1 mL)} \times \text{inverso do fator de diluição} = \text{UFC/mL}}$$

As placas de MRSA eram avaliadas qualitativamente através da observação de colónias com morfologia característica (Figura 7).

Figura 7 – Resultados das sementeiras realizadas durante o protocolo experimental laboratorial (original)



A – sementeira de uma amostra recolhida pré-asepsia, em meio MRSA com crescimento presuntivo MRSA (roxo); **B** – sementeira de uma amostra recolhida pré-asepsia, em meio MRSA com crescimento presuntivo de MRSE (azul); **C** – sementeira de uma colónia isolada de B, em meio COS

No caso de se observar o desenvolvimento de colónias, estas eram isoladas em meio de columbia agar sangue (Biomérieux® ref 43041– Blood Agar culture media + 5% sheep blood – COS), para posterior observação microscópica após coloração de Gram e identificação. Os isolados com morfologia de cocos gram-positivos foram posteriormente avaliados através dos

testes de catalase e de Hidróxido de potássio (KOH) e identificados através de galerias de identificação bioquímica API® Staph, se apresentassem resposta positiva no teste de catalase (Figura 9). Os isolados com morfologia de bacilos gram-positivos foram submetidos aos testes de catalase e de KOH e identificados através de galerias API® Coryne, se catalase positiva. Os isolados com morfologia de bacilos gram-negativos foram submetidos aos testes de oxidase e de KOH e identificados através de galerias API® 20E (Figura 9), quando oxidase negativa. Por fim, os isolados com morfologia de cocobacilos gram-positivos foram semeados em meio de Edwards agar e em meio de Slanetz and Bartley agar, para identificação presuntiva de bactérias pertencentes ao género *Enterococcus* (Figura 8).

Figura 8 – Sementeira de cocobacilos gram-positivos em meio de Edwards agar (D) e de Slanetz and Bartley agar (E) (original)

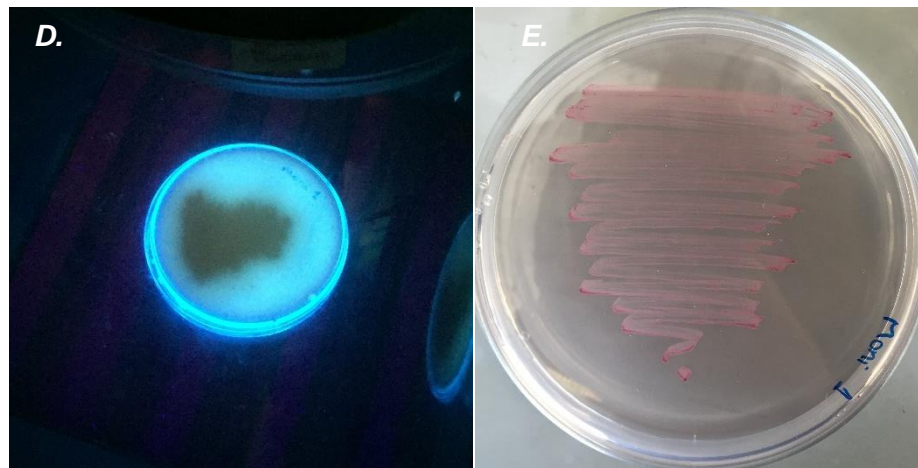


Figura 9 – Resultado de uma galeria de identificação bioquímica de um isolado com morfologia de bacilos gram-negativo - API® 20E (F) e de uma galeria de identificação bioquímica de um isolado com morfologia de cocos gram-positivos - API® Staph (G) (original)



6.4 Análise Estatística

Para análise estatística, os dados foram organizados no programa Excel do Microsoft Office 2016 e a análise estatística realizada no programa R®, versão 3.4.0, em associação com a extensão Rcmdr (*R commander*). Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Para este estudo, recorreu-se aos testes de medidas repetidas ANOVA, uma vez que havia um fator comum para cada um dos tempos de amostragem: o doente. Assim, uma vez que o mesmo indivíduo está a ser considerado em várias situações, estes testes removem a diferença individual entre a variabilidade de amostras, sendo o resultado estatístico obtido semelhante aos resultados obtidos para medidas independentes. Como tal, neste estudo, as variáveis independentes são os momentos da recolha das amostras, pré-asepsia e pós-asepsia, e a variável repetida é o indivíduo.

Para a descrição da amostra, foram realizados testes de Shapiro-Wilk para determinar a normalidade das variáveis da amostra, considerando-se uma distribuição normal para $p > 0,05$. No caso de não apresentarem uma distribuição normal, como se verificou para a variável peso, utilizaram-se testes de Wilcoxon.

Para efeitos estatísticos, as quantificações microbianas em meio de cultura BHI foram posteriormente convertidas para logaritmos de base 10, tendo sido utilizada a fórmula $\log_{10}(\text{UFC}/\text{mL}+1)$, de modo a incluir todas as quantificações nulas do momento pós-asepsia, uma vez que $\log_{10}(0)$ não é matematicamente possível e $\log_{10}(1) = 0$.

As placas onde a quantificação se revelou incontável (Figura 11) foram consideradas como $>10^9$ UFC/mL, ou seja, $>9 \log_{10}$.

Figura 10 – Sementeira em meio BHI agar com quantificação bacteriana incontável (original)



7. RESULTADOS

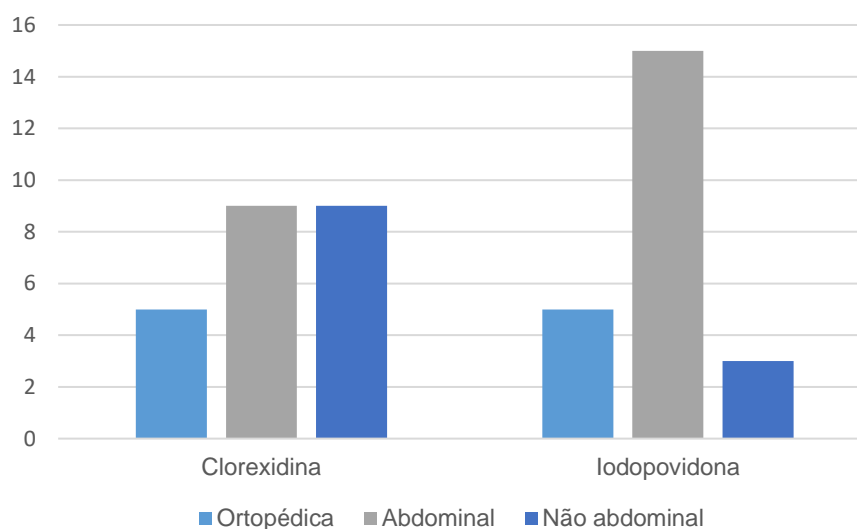
7.1 População em estudo

Um total de 46 canídeos foram aleatoriamente seleccionados para este estudo: 23 animais para a avaliação do protocolo da assepsia com clorexidina e 23 para a avaliação do protocolo com iodopovidona. A distribuição dos canídeos incluídos em ambos os grupos foi semelhante (Tabela 6), nomeadamente no que diz respeito às características demográficas, raças, doenças concomitantes, fatores de risco para infeção, exposição prévia a antibioterapia e imunossuppressores e tipo de cirurgia (Gráfico 7), ainda que tais fatores não tenham sido considerados aquando da amostragem.

Tabela 6 – Características dos canídeos em estudo

Características dos Canídeos	Clorexidina (N=23)	Iodopovidona (N=23)
Número de machos	9	8
Número de fêmeas	14	15
Idade (\bar{X} em anos)	6,65	6,62
Peso (\bar{X} em quilogramas)	15,75	16,23
Cirurgia ortopédica	5	5
Cirurgia abdominal	9	15
Cirurgia não-abdominal	9	3
Antibioterapia profilática	23	23
Infeção do local cirúrgico às 24h	0	0
Infeção do local cirúrgico ao 10º dia	0	0

Gráfico 7 – Distribuição da amostra por tipo de cirurgia, por agente

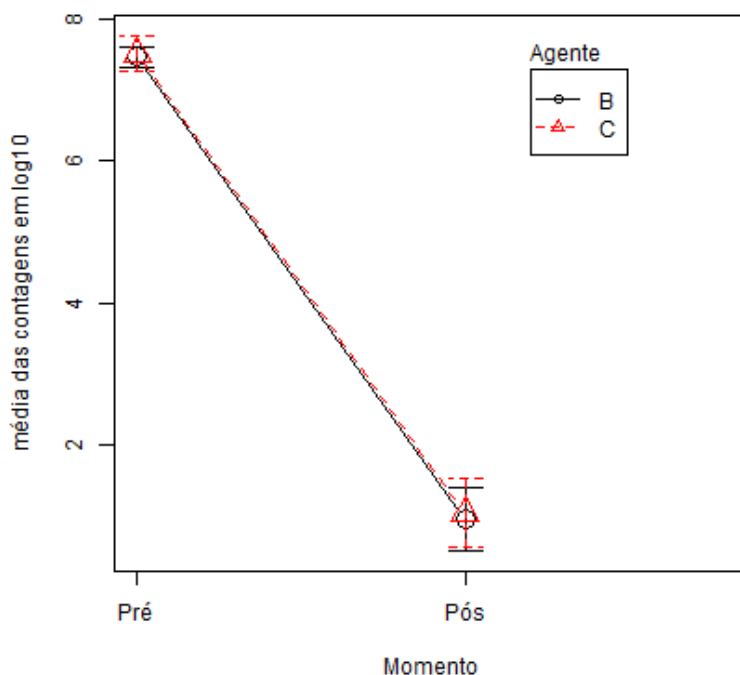


7.2 Quantificação bacteriana em BHI agar

Para a avaliação da redução logarítmica da quantificação bacteriana foram contabilizadas as UFC em placas de BHI agar. A quantificação bacteriana neste meio referente ao protocolo da clorexidina revelou uma média basal de contagens pré-asepsia de $4,0 \times 10^8$ UFC/mL e a uma média pós-asepsia de $4,42 \times 10^7$ UFC/mL. Já para o protocolo da iodopovidona, verificou-se para o momento pré-asepsia uma média de $8,03 \times 10^7$ UFC/mL e para o momento pós-asepsia uma média de $4,35 \times 10^7$ UFC/mL. Importa ainda referir que 16 dos canídeos de cada grupo apresentaram quantificação microbiana pós-assépsia de 0 UFC/mL e que se verificou 1 quantificação incontável ($>10^9$) para cada protocolo no momento pós-asepsia.

Porém, para análise estatística, todos os valores das quantificações em cada momento foram convertidos em $\log_{10}(\text{UFC/mL}+1)$. Posteriormente procedeu-se ao cálculo da redução logarítmica através da subtração dos valores logarítmicos correspondentes ao momento pós-asepsia e pré-asepsia para os 23 canídeos de cada protocolo, calculando-se de seguida a média desses valores para ambos os protocolos para obter as reduções logarítmicas médias dos dois protocolos em estudo. Assim, para a clorexidina verificou-se uma média logarítmica basal de 7,51 \log_{10} e uma média logarítmica pós-asepsia de 1,05 \log_{10} , demonstrando uma redução logarítmica média de $6,46 \pm 2,62 \log_{10}$ (média \pm desvio padrão). Já para o protocolo da iodopovidona, verificou-se uma média logarítmica basal de 7,47 \log_{10} e uma média logarítmica pós-asepsia de 0,95 \log_{10} , observando-se uma redução logarítmica de $6,51 \pm 1,94 \log_{10}$ (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Redução logarítmica da quantificação bacteriana para a iodopovidona (B) e clorexidina (C)



A distribuição das reduções logarítmicas para ambos os biocidas foi muito semelhante (Gráficos 9 e 10), distribuindo-se maioritariamente nos intervalos de reduções de 4 a 10 logaritmos para ambos os protocolos sendo a curva de distribuição das 23 reduções logarítmicas muito semelhante para ambos os agentes (Gráfico 11).

Gráfico 9 – Histograma da redução logarítmica de UFC/mL para Iodopovidona (B)

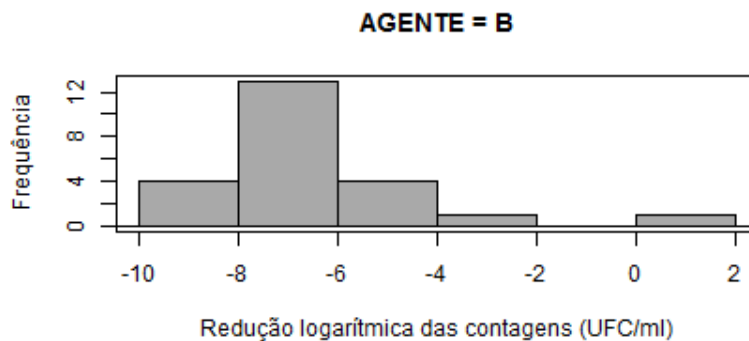


Gráfico 10 – Histograma da redução logarítmica de UFC/mL para Clorexidina (C)

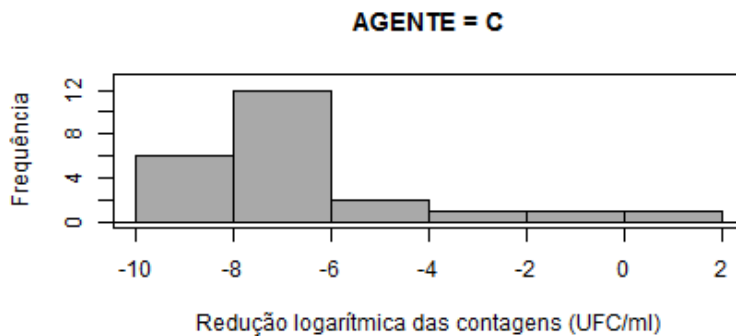
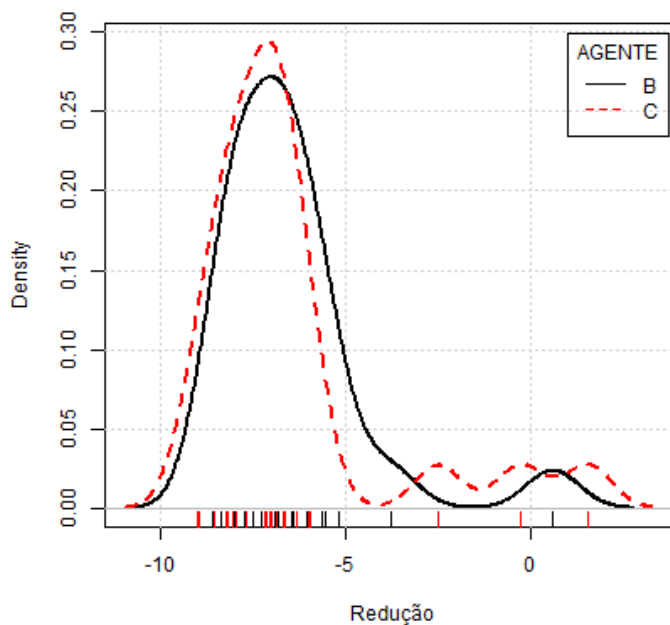


Gráfico 11 – Gráfico de *densityPlot* correspondendo à distribuição da redução logarítmica para os grupos de estudo iodopovidona (B) e clorexidina (C)



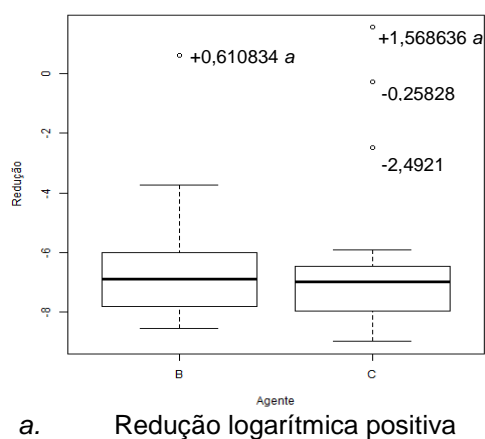
Assim, utilizando-se o teste de ANOVA para medidas repetidas, a análise estatística realizada demonstrou que não há diferença significativa entre a redução bacteriana de ambos os biocidas (p value $>0,05$), uma vez que a diferença entre a quantificação bacteriana a partir da amostra recolhida no momento pré-assepsia e no momento pós-assepsia é estatisticamente significativa (p value $<0,05$), independentemente do agente utilizado (p value $>0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Valores de significância estatística de p value

Parâmetros analisados	ANOVA <i>repeated measures</i> p value
Diferença entre os biocidas utilizados	0,898
Diferença quantitativa entre os momentos pré-assepsia e pós-assepsia	$<2 \times 10^{-16}$
Diferença entre os momentos e o agente utilizado	0,673

Do total da amostra em estudo, cerca de 26% (6/23) dos animais submetidos ao protocolo de assepsia pré-cirúrgica com iodopovidona e cerca de 30% (7/23) dos doentes submetidos ao protocolo com clorexidina apresentaram culturas bacterianas positivas a partir da cultura recolhida no momento pós-assepsia. Apenas cerca de 4,3% (1/23) dos animais do grupo da iodopovidona e 13% (3/23) do grupo da clorexidina não apresentaram uma redução logarítmica significativa relativamente à quantificação bacteriana realizada pré e pós assepsia (Gráfico 12). Nesta amostra, foi ainda observado um aumento da quantificação bacteriana entre as amostras pré-assepsia e pós-assepsia em 1 dos indivíduos de cada grupo, sendo que em ambos os animais foi impossível realizar uma quantificação precisa das UFC obtidas nas placas semeadas a partir da amostra colhida pós-assepsia.

Gráfico 12 – Gráfico de *Boxplot* com evidenciação dos quatro valores *outliers*



Verificou-se ainda que cerca de 26% (6/23) das zaragoas provenientes das lâminas de incisão da pele pós-asepsia do grupo da iodopovidona e 30,4% (7/23) do grupo da clorexidina apresentaram culturas microbianas, sendo que 13% (3/23) das zaragoas das lâminas do grupo da iodopovidona e 21,7% (5/23) no grupo da clorexidina apresentam culturas microbianas, apesar de as culturas realizadas a partir das zaragoas colhidas no momento pós-asepsia terem sido negativas.

Ainda assim, nenhum canídeo de ambos os grupos apresentou infeções do local cirúrgico, nem às 24h pós-cirúrgicas nem ao 10^o dia pós-cirúrgico.

7.3 Culturas bacterianas em meio MRSA modificado

Relativamente às culturas realizadas em meio de MRSA modificado, cerca de 39,1% (18/46) das amostras correspondentes à zaragoa do momento pré-asepsia apresentaram crescimento bacteriano no meio de MRSA agar cromogénico modificado. Verificou-se ainda que nenhuma das sementeiras realizadas a partir das zaragoas colhidas no momento pós-asepsia e da lâmina de bisturi apresentaram crescimento bacteriano neste meio, quer no grupo da clorexidina quer no grupo da iodopovidona.

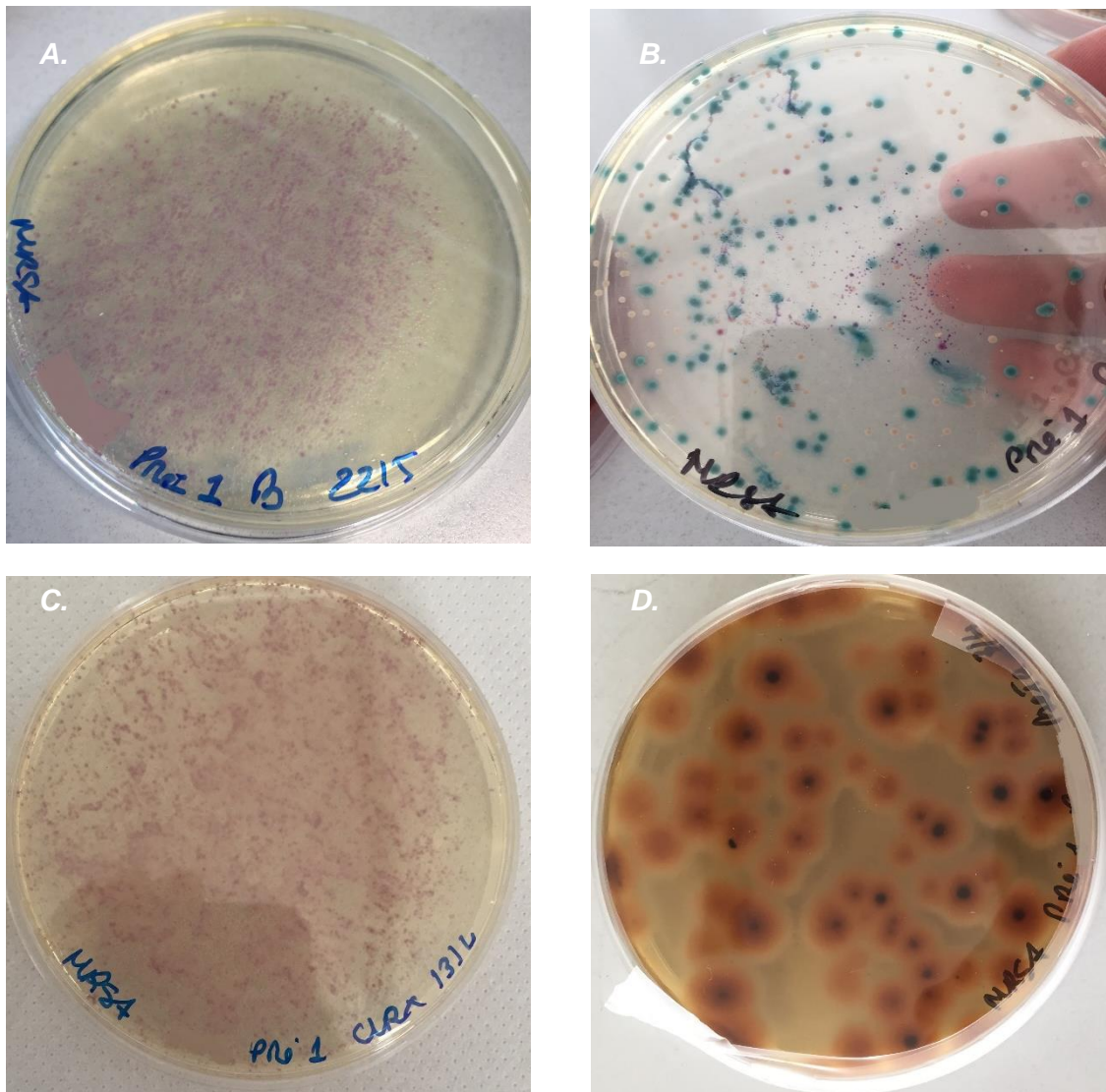
Das culturas positivas no meio de MRSA, cerca de 72,2% (13/18) apresentavam colónias de cor roxa que, segundo o fabricante do meio, seriam sugestivas de *S. aureus*, 38,9% (7/18) apresentavam colónias de cor azulada, sugestivas de *S. epidermidis*, e 16,7% (3/18) apresentavam colónias de cor branca, não havendo indicação quanto à identificação presuntiva deste tipo de colónias (Figura 12). Posteriormente, todas as culturas foram analisadas segundo os protocolos estipulados para identificação sendo que de todos os isolados apenas 1 se confirmou ser *Staphylococcus aureus* e 1 *Staphylococcus epidermidis*. Os falsos positivos isolados foram maioritariamente outras bactérias do género *Staphylococcus* e ainda da família Enterobacteriaceae. Verificou-se ainda multiplicação de fungos filamentosos num dos animais (Tabela 8).

Tabela 8 – Identificação das bactérias isoladas a partir do meio de MRSA modificado

Código do animal	Características das culturas		Após identificação
	Meio MRSA (Pré-assepsia)	Meio MRSA (Pós-assepsia)	
8	Fungos filamentosos	0	-
10	colónias roxas	0	<i>Enterobacter cloacae</i>
12	colónias azuis	0	<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>
13	colónias roxas	0	<i>Enterobacter cloacae</i>
15	colónias azuis	0	<i>Staphylococcus aureus</i>
16	colónias roxas	0	<i>Enterobacter cloacae</i>
20	colónias roxas	0	<i>Enterobacter cloacae</i>
22	colónias roxas	0	<i>Staphylococcus capitis</i>
23	colónias azuis	0	<i>Cellulomonas sp.</i> ^a
26	colónias roxas	0	<i>Proteus sp.</i>
34	colónias brancas + roxas	0	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
35	colónias azuis + brancas + roxas	0	<i>Staphylococcus xylosum</i> + <i>Staphylococcus sciuri</i>
36	colónias azuis + brancas + roxas	0	<i>Staphylococcus sciuri</i>
37	colónias Roxo	0	<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae 1</i>
42	colónias roxas	0	<i>Klebsiella sp.</i>
43	colónias roxas	0	<i>Enterobacter cloacae</i>
44	colónias roxas + azuis	0	<i>Staphylococcus xylosum</i> + <i>Serratia sp.</i> + <i>Enterococcus sp.</i>
45	colónias azuis	0	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

a. perfil inaceitável

Figura 11 – Aspecto morfológico das culturas correspondentes às sementeiras recolhidas na fase de pré-assepsia, em meio de MRSA agar (original)



A – multiplicação presuntiva de MRSA (roxo); **B** – multiplicação presuntiva de *S. epidermidis* resistente à meticilina (azul) e de MRSA (roxo); **C** – multiplicação presuntiva de MRSA (roxo); **D** – multiplicação de fungos filamentosos

8. DISCUSSÃO

Num contexto cirúrgico a assepsia pré-operatória da pele é uma das medidas preventivas de infeções do local cirúrgico mais importante, sendo que a contaminação microbiana é um pré-requisito para a ocorrência de infeções do local cirúrgico, e a microbiota do paciente a principal causa deste tipo de infeções (World Health Organization, 2016). Este procedimento visa a eliminação da microbiota transiente e a maior redução possível da microbiota residente na pele, prevenindo a curto prazo (i.e. horas) a sua multiplicação e contaminação por bactérias patogénicas oportunistas (Anderson *et al.*, 2013; Renberg, 2011). A iodopovidona e a clorexidina são os dois agentes antissépticos mais eficazes e comumente utilizados na preparação pré-cirúrgica dos doentes (Anderson *et al.*, 2013). De acordo com a OMS (2016), em cirurgia humana deve recorrer-se a soluções alcoólicas de clorexidina para a preparação do local cirúrgico, porém em cirurgia veterinária não existe tal recomendação, permanecendo controverso qual dos dois será o melhor biocida na prevenção de infeções do local cirúrgico (Gibson *et al.*, 1997; Osuna *et al.*, 1990).

Tendo esta realidade por base, procurou-se com o presente estudo realizado em canídeos, comparar a eficácia dos dois protocolos mais frequentemente utilizados, verificando-se que os resultados obtidos estão em linha com os estudos de Gibson *et al.* (1997) e Osuna *et al.* (1990), uma vez que a clorexidina e a iodopovidona apresentaram eficácia semelhante como protocolo de assepsia pré-cirúrgica, não se registando diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) na redução logarítmica ocorrida entre a quantificação bacteriana obtida a partir da sementeira das amostras recolhidas do tempo pré-assepsia e do tempo pós-assepsia, tanto para a iodopovidona como para a clorexidina, pelo que foi possível concluir que a eficácia de ambos os protocolos aparenta ser semelhante.

Assim sendo, os resultados obtidos com o presente estudo divergem das diretivas da OMS (World Health Organization, 2016) e do CDC (Berríos-Torres *et al.*, 2017) realizadas para a medicina humana, já que não se observou uma superioridade de eficácia da solução alcoólica, especificamente da clorexidina, face à solução aquosa de iodopovidona. Os resultados divergem ainda dos estudos realizados em medicina humana por Darouiche *et al.* (2010) e por Hibbard (2005), onde concluem que as soluções alcoólicas de clorexidina apresentam eficácia superior à da iodopovidona. Como tal, à falta de recomendações e diretivas específicas sobre o modo de realização de assepsia pré-cirúrgica em medicina veterinária, poderão os cirurgiões veterinários considerar o que vem estabelecido nos livros de texto de cirurgia de pequenos animais e escolher de entre estes dois biocidas, o que mais se adequa ao seu conhecimento quanto ao produto e à técnica de aplicação (Hemani & Lepor, 2009; Renberg, 2011).

Contudo, o facto de no presente estudo se ter comparado a eficácia de uma solução alcoólica de clorexidina com uma solução aquosa de iodopovidona, sabendo à partida que as soluções alcoólicas apresentam melhor eficácia devido ao elevado efeito antisséptico imediato do álcool (Mangram *et al.*, 1999; World Health Organization, 2016) pode constituir uma das críticas a apontar, de igual modo ao que vem referido no estudo realizado em medicina humana por Anderson *et al.*, 2013. Ainda assim, a solução aquosa de iodopovidona apresentou uma redução logarítmica estatisticamente semelhante à solução alcoólica de clorexidina ($p > 0,05$).

De acordo com a “*Tentative Final Monograph*” (TFM) publicada pela FDA em 1994, o critério de eficácia de “preparações pré-cirúrgicas da pele do doente” aplicado para produtos que contenham álcool ou iodóforos como o ingrediente ativo em medicina humana, aplicados em regiões anatómicas secas, como o abdómen, requer uma redução de pelo menos 2 log10 aos 10 minutos após aplicação, relativamente às UFC presentes nas amostras colhidas no momento de pré-asepsia; em regiões anatómicas húmidas, como as axilas ou as virilhas, este critério preconiza uma redução de pelo menos 3 log10 (Seal & Paul-Cheadle, 2004).

Os resultados do presente estudo revelam a presença de uma redução logarítmica média superior à indicada pela TFM da FDA quer através do protocolo da iodopovidona, quer do protocolo da clorexidina. Porém, estes valores de referência aplicam-se a doentes de cirurgia humana e requerem atualização para inclusão de outros produtos antissépticos, como a clorexidina. Em neurocirurgia humana, ao estudarem a relação entre a quantificação microbiana pré-cirúrgica com a incidência de infeções do local cirúrgico, Cronquist *et al.* (2001) concluíram que a média das contagens microbianas nas amostras em estudo variava significativamente entre regiões anatómicas, verificando-se ao nível da cabeça uma média logarítmica pré-asepsia de 4,13 log10 e pós-asepsia de 0,62 log10, enquanto que, ao nível da coluna as médias eram de 2,39 log10 e 0,54 log10, respetivamente (Cronquist, Jakob, Lai, Della Latta, & Larson, 2001). Daqui se conclui que a média logarítmica da quantidade de bactérias presentes na pele dos humanos é muito inferior à média demonstrada nos grupos de canídeos em estudo, pelo que a redução logarítmica exigida deverá ser menor, aproximando-se dos valores referidos pela TFM da FDA. Esta média de quantificação bacteriana mais elevada em canídeos aparenta ser um desafio maior quando comparada com a dos humanos, na medida em que os canídeos apresentam pelagem mais espessa, menor frequência de higienização e um ambiente mais contaminado, podendo as técnicas que funcionam bem em humanos apresentar eficácias diferentes nos animais (Gibson *et al.*, 1997). Interessantemente, com os resultados do presente estudo foi possível demonstrar que a lâmina de bisturi pode funcionar ela própria como fomite de bactérias, veiculando-as para o interior do local cirúrgico após a abertura do mesmo. Ainda assim, não foi possível demonstrar a relevância do ato de trocar a lâmina logo após a incisão, de modo a que a lâmina que incida

a pele seja descartada e não comunique mais com o espaço interior cavitário do animal, uma vez que não foram observadas infeções pós-operatórias do local cirúrgico associadas a estes doentes intervencionados e que a lâmina foi descartada após a recolha da zaragatoa. Mais, nenhum dos indivíduos apresentou infeções do local cirúrgico, nem às 24h, nem ao décimo dia pós-operatório, podendo tal dever-se à profilaxia antimicrobiana adequadamente instituída com o protocolo utilizado na totalidade das cirurgias realizadas neste estudo.

O facto de se ter observado culturas bacterianas positivas a partir de amostras recolhidas das lâminas, apesar de não se ter verificado a partir da amostra recolhida do momento pós-assepsia correspondente, pode advir da contaminação do local cirúrgico pelo contacto do cirurgião ou membro da equipa cirúrgica com zonas não esterilizadas ou do contacto de zonas não esterilizadas com o local esterilizado durante o transporte do doente para o bloco operatório, tendo em conta que, de acordo com um estudo recente de Anderson et al (2013), o contacto pós-assepsia das mãos do cirurgião não esterilizadas com o local cirúrgico se verifica em pelo menos 36% dos casos (Anderson *et al.*, 2013). Neste mesmo estudo, os autores demonstraram que a contaminação externa das luvas cirúrgicas estéreis ocorre ocasionalmente, podendo tal constituir uma fonte de contaminação do local cirúrgico (Anderson *et al.*, 2013), e assim justificar a presença de bactérias na lâmina de bisturi e no momento pós-assepsia.

Além da contaminação externa das luvas cirúrgicas, as perdas através das luvas e a sua perfuração durante procedimentos cirúrgicos são também acontecimentos prováveis. Assim, de acordo com o estudo em medicina humana de Misteli *et al.* (2009), a assepsia é comprometida devido a perdas através das luvas em 16,3% dos casos, sendo que em 7,5% destes casos os doentes contraíram infeções do local cirúrgico. Neste mesmo estudo verificou-se perfuração das luvas em 34% dos procedimentos que duraram mais de 2 horas e em 9,4% dos procedimentos que duraram 2 ou menos horas (Misteli *et al.*, 2009). Em medicina veterinária num estudo realizado por Anderson *et al.* (2013) em 2 hospitais de animais de companhia, foi possível verificar que a perfuração de luvas durante os procedimentos cirúrgicos ocorre em 38,7% dos casos, sem deteção pela equipa (Anderson *et al.*, 2013). Posto isto, o risco de contaminação e consequentemente de infeções do local cirúrgico após perfuração das luvas é estatisticamente superior quando não há uma antibioterapia profilática instituída (Misteli *et al.*, 2009). Como tal, a assepsia das mãos previamente ao procedimento cirúrgico permanece como um ponto crítico e de extrema importância, devendo por isso ser sempre associada às medidas para a redução de infeções do local cirúrgico associadas à perfuração das luvas, as quais compreendem a utilização de luvas em duplicado, a troca de luvas durante procedimentos longos e o recurso à antibioterapia profilática em todos os procedimentos, na ausência de outras precauções para a prevenção da perfuração das luvas (Misteli *et al.*, 2009).

Na interpretação dos resultados obtidos com o presente estudo, é necessário considerar algumas limitações nomeadamente o facto de este ter sido realizado com base em amostras obtidas apenas a partir de cães. Ainda assim, as amostras foram colhidas a partir de animais sujeitos a uma grande variedade de intervenções e locais cirúrgicos, o que se revelou num fraco poder estatístico de comparação entre regiões anatómicas, não sendo por isso possível concluir sobre diferenças entre regiões nas contagens bacterianas e na eficácia dos protocolos.

No que respeita ao tipo de agente bacteriano presente, foi possível verificar que em relação à identificação de staphylococci resistentes a antibióticos, de todas as amostras positivas no meio de MRSA cromogénico modificado, a maioria das culturas obtidas foi identificada como não sendo *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus epidermidis*, ao contrário do que seria expectável pelas indicações do fabricante do meio. Outras espécies bacterianas resistentes à meticilina cresceram neste meio, principalmente outras espécies de staphylococci, tais como *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri* e *S. capitis*, e ainda *Klebsiella* sp., *Serratia* sp., *Enterobacter cloacae* e *Enterococcus* sp..

O meio cromogénico utilizado durante a realização do presente ensaio para a identificação de MRSA é suplementado com cefoxitina, a qual, à semelhança da cefamicina, apresenta uma melhor seletividade do que a oxacilina e a meticilina para identificação de MRSA, sendo que na presença de cefoxitina, as estirpes de MRSA crescem muito mais rapidamente do que na presença de oxacilina (Hoecke, Deloof, & Claeys, 2011; Perry *et al.*, 2004).

Estes meios de agar cromogénico seletivos para MRSA são muito utilizados, uma vez que são de fácil interpretação, embora possam apresentar resultados falsos-positivos. Por exemplo, o meio de CHROMagar MRSA permite o crescimento de outras bactérias que não *S. aureus* (Micheel *et al.*, 2015). De acordo com os autores, foi possível com este meio identificar bactérias pertencentes às espécies *Staphylococcus kloosii*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus cohnii*, *Macroccoccus caseolyticus* e *Corynebacterium* spp. cujas colónias apresentavam morfologia macroscópica semelhante a *S. aureus* (Micheel *et al.*, 2015).

Já em 1962, Baird-Parker, quando descreveu pela primeira vez o meio de agar seletivo Baird-parker, o qual permite a multiplicação de *S. aureus* e inibe o crescimento da maioria das outras espécies bacterianas, referiu a possibilidade de nele se registar o crescimento de *Staphylococcus saprophyticus*, assim como outros staphylococci coagulase-positivo (Baird-Parker, 1962).

De acordo com o estudo de Micheel *et al.* (2015), a partir de culturas cuja morfologia não era suspeita de MRSA em meio CHROMagar MRSA, foi possível isolar-se MRSA recorrendo a outro meio seletivo para estas estirpes: o meio agar de chromID MRSA (Micheel *et al.*, 2015). Assim, estes resultados de Micheel *et al.* (2015) estão em linha com os obtidos no presente

estudo, onde a utilização individual de um meio de agar cromogénico seletivo se demonstrou não específica para o diagnóstico presuntivo da presença de MRSA na pele dos canídeos. Como tal, a utilização combinada de dois meios seletivos para MRSA (Micheel *et al.*, 2015) ou a utilização combinada de outros métodos para identificação destes agentes deverá ser realizada com o objetivo de aumentar a especificidade de deteção.

Verificou-se ainda que cerca de 33% das amostras estudadas originaram culturas de Enterobacteriaceae e cerca de 6% originaram culturas de fungos no meio de MRSA, o que, apesar de não estar descrito para este meio, já foi descrito por Hoecke *et al.* (2011) para o meio cromogénico ChromID MRSA. Ao avaliarem o desempenho deste meio na deteção de MRSA, estes autores concluíram que a maioria das colónias falsos-positivos eram identificadas como Enterobacteriaceae ou fungos (Hoecke *et al.*, 2011).

Para além disto, de acordo com Nahimana *et al.* (2006), as espécies responsáveis por falsos-positivos em meio de MRSA são principalmente do género staphylococci, sendo também possível encontrar bactérias de outros géneros, tais como *Proteus*, *Corynebacterium* e *Micrococcus* (Nahimana, Francioli, & Blanc, 2006).

Relativamente a estudos futuros, será sempre interessante considerar o desenvolvimento do mesmo numa amostra de maior dimensão, assim como uma separação estatisticamente significativa das regiões anatómicas sujeitas a cirurgia, permitindo avaliar se existem ou não diferenças entre estas. Ainda, considerando que a obesidade é um fator de risco para infeções do local cirúrgico (Nelson, 2011), pode também ponderar-se num estudo futuro a influência do peso corporal na quantificação microbiana através da criação de grupos, como por exemplo escolhendo apenas uma raça, para se obter uma uniformização das classes de peso corporal. Ainda, o estudo da microbiota da pele de felídeos e a sua comparação com a dos canídeos, bem como avaliar e comparar a eficácia dos protocolos de assepsia utilizados no cão nesta espécie, serão também linhas interessantes de estudo futuro.

Um próximo passo deste estudo poderia recorrer aos novos métodos de sequenciação para identificação de toda a microbiota presente na pele dos animais antes e após a assepsia cirúrgica. Para além disso, poderia fazer-se, à semelhança do trabalho de Anderson *et al.* (2013), um estudo recorrendo a câmaras de vigilância para monitorização e controlo de todos os passos da assepsia cirúrgica, identificando as falhas de modo a adaptar e melhorar os pontos mais críticos.

9. CONCLUSÕES

A informação disponível relativamente a estudos sobre a eficácia e comparação entre protocolos de assepsia em cirurgia veterinária, é ainda muito limitada, pelo que os livros de texto de cirurgia veterinária e as recomendações estipuladas para a cirurgia humana permanecem como as principais fontes de informação sobre protocolos para preparação pré-cirúrgica dos doentes e do cirurgião.

Daqui emerge a necessidade da realização de mais estudos em cirurgia veterinária que objetivem a elaboração e implementação de diretivas para a assepsia do cirurgião e do doente veterinário, procurando melhorar e uniformizar os protocolos de assepsia em cirurgia veterinária e diminuir assim a incidência de infeções do local cirúrgico.

Os protocolos de assepsia disponíveis recorrendo ao uso dos biocidas iodopovidona ou clorexidina são os dois mais utilizados, quer em cirurgia humana, quer em cirurgia veterinária. De acordo com o nosso estudo, a utilização de qualquer um destes protocolos aparenta ter uma eficácia semelhante em termos de assepsia e na redução da quantidade de bactérias, incluindo espécies bacterianas resistentes à metilicina, presentes na pele dos canídeos submetidos a cirurgias.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexander, J. W. (1985). The contributions of infection control to a century of surgical progress. *Annals of Surgery*, 201(4), 423–8.
- Altemeier, W. A., Culbertson, W. R., & Hummel, R. P. (1968). Surgical considerations of endogenous infections-sources, types, and methods of control. *The Surgical Clinics of North America*, 48(1), 227–40. [https://doi.org/10.1016/S0039-6109\(16\)38448-1](https://doi.org/10.1016/S0039-6109(16)38448-1)
- Anderson, M. E. C., Foster, B. A., & Weese, J. S. (2013). Observational study of patient and surgeon preoperative preparation in ten companion animal clinics in Ontario, Canada. *BMC Veterinary Research*, 9(194), 1–11.
- Arciola, C. R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., & Costerton, J. W. (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, 33(26), 5967–5982. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.031>
- Baird-Parker, A. C. (1962). An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive Staphylococci. *Journal of Applied Bacteriology*, 25(1), 12–19.
- Berríos-Torres, S. I., Umscheid, C. A., Bratzler, D. W., Leas, B., Stone, E. C., Kelz, R. R., Reinke, C. E., Morgan, S., Solomkin, J. S., Mazuski, J. E., Dellinger, E. P., Itani, K. M. F., Berbari, E. F., Segreti, J., Parvizi, J., Blanchard, J., Allen, G., Kluytmans, J. A. J. W., Donlan, R. & Schechter, W. P. (2017). Centers for Disease Control and Prevention Guideline for the Prevention of Surgical Site Infection, 2017. *JAMA Surgery*, 1–8. <https://doi.org/10.1001/jamasurg.2017.0904>
- Capriotti, K., & Capriotti, J. A. (2012). Topical iodophor preparations: Chemistry, microbiology, and clinical utility. *Dermatology Online Journal*, 18(11).
- CDC. (2014). Top CDC Recommendations to Prevent Healthcare - Associated Infections. *National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases Division*.
- Chapman, J. S. (2003). Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 51(2), 133–138. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(02\)00097-5](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(02)00097-5)
- Cogen, A. L., Nizet, V., & Gallo, R. L. (2008). Skin microbiota: A source of disease or defence? *British Journal of Dermatology*, 158(3), 442–455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08437.x>

- Condell, O., Power, K., Händler, K., Finn, S., Sheridan, A., Sergeant, K., Renaut, J., Burgess, C. M., Hinton, J. C.D., Nally, J.E. & Fanning, S. (2014). A question of nature: Some antigens are bound to be allergens. *Frontiers in Microbiology*, 5(373), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00373>
- Cronquist, A. B., Jakob, K., Lai, L., Della Latta, P., & Larson, E. L. (2001). Relationship between skin microbial counts and surgical site infection after neurosurgery. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33(8), 1302–8. <https://doi.org/10.1086/322661>
- Cuscó, A., Sánchez, A., Altet, L., Ferrer, L., & Francino, O. (2017). Individual Signatures Define Canine Skin Microbiota Composition and Variability. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(February), 1–6. <https://doi.org/10.3389/FVETS.2017.00006>
- Digison, M. B. (2007). A review of anti-septic agents for pre-operative skin preparation. *Plastic Surgical Nursing: Official Journal of the American Society of Plastic and Reconstructive Surgical Nurses*, 27(4), 185–9–1. <https://doi.org/10.1097/01.PSN.0000306182.50071.e2>
- Dominioni, L., Imperatori, A., Rotolo, N., & Rovera, F. (2006). Risk Factors for Surgical Infections. *Surgical Infections (Larchmt)*, 7(Supplement 2), S9–S12.
- Dumville, J., Mcfarlane, E., Edwards, P., Lipp, A., Holmes, A., & Liu, Z. (2015). Preoperative skin antiseptics for preventing surgical wound infections after clean surgery (Review). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (4). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003949.pub4.www.cochranelibrary.com>
- Durani, P., & Leaper, D. (2008). Povidone-iodine: Use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. *International Wound Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00405.x>
- Eugster, S., Schawalder, P., Gaschen, F., & Boerlin, P. (2004). A prospective study of postoperative surgical site infections in dogs and cats. *Veterinary Surgery*, 33(5), 542–550. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2004.04076.x>
- Fitzgerald, K. A., Davies, A., & Russell, A. D. (1989). Uptake of ¹⁴C-chlorhexidine diacetate to *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and its release by azolectin. *FEMS Microbiology Letters*, 60, 327–32.
- Fossum, T. W. (2012). Preparation of the operative site. In *Small Animal Surgery* (4th ed., pp. 39–44). St. Louis: Elsevier Mosby.

- Garibaldi, R. A., Skolnick, D., Lerer, T., Poirot, A., Graham, J., Krisuinas, E., & Lyons, R. (1988). The impact of preoperative skin disinfection on preventing intraoperative wound contamination. *Infection Control and Hospital Epidemiology: The Official Journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 9(3), 109–13. <https://doi.org/10.1086/645805>
- Gaynes, R. P., & Horan, T. C. (1996). Surveillance of nosocomial infections. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Giamarellou, H., & Antoniadou, A. (1996). Epidemiology, diagnosis, and therapy of fungal infections in surgery. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 17(8), 558–564.
- Gibson, K. L., Donald, A. W., Hariharan, H., & McCarville, C. (1997). Comparison of Two Pre-Surgical Skin Preparation Techniques. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 61(2), 154–156.
- Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
- Hanselman, B. A., Kruth, S. A., Rousseau, J., Low, D. E., Willey, B. M., McGeer, A., & Weese, J. S. (2006). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel. *Emerging Infectious Diseases*, 12(12), 1933–1938. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060231>
- Hemani, M. L., & Lepor, H. (2009). Skin preparation for the prevention of surgical site infection: which agent is best? *Reviews in Urology*, 11(4), 190–5. <https://doi.org/10.3909/riu0467>
- Hibbard, J. S. (2005). Analyses Comparing the Antimicrobial Activity and Safety of Current Antiseptic Agents: A Review. *Journal of Infusion Nursing*, 28(3), 194–207. <https://doi.org/10.1097/00129804-200505000-00008>
- Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., & Fridkin, S. K. (2014). Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Annual Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006 – 2007. <https://doi.org/10.1086/591861>

- Hoecke, F. Van, Deloof, N., & Claeys, G. (2011). Performance evaluation of a modified chromogenic medium, ChromID MRSA New, for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30, 1595–1598. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1265-3>
- Hoffmann, A. R., Patterson, A. P., Diesel, A., Lawhon, S. D., Ly, H. J., Stephenson, C. E., Mansell, J., Steiner, J. M., Dowd, S. E., Olivry, T. & Suchodolski, J. S. (2014). The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLOS ONE*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.003197>
- Horan, T. C., Gaynes, R. P., Martone, W. J., & Jarvis, W. R. (1992). CDC definitions of nosocomial surgical site infections, 1992: A modification of CDC definitions of surgical wound infections. *Hospital Epidemiology and Infection Control*. <https://doi.org/10.1017/S0195941700015241>
- James, R. C., & Macleod, C. J. (1961). Induction of staphylococcal infections in mice with small inocula introduced on sutures. *British Journal of Experimental Pathology*, 42(3), 266–77.
- Karpiński, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2015). Chlorhexidine - Pharmaco-biological activity and application. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(7), 1321–1326.
- Krizek, T. J., & Robson, M. C. (1975). Evolution of quantitative bacteriology in wound management. *The American Journal of Surgery*, 130(5), 579–584. [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(75\)90516-4](https://doi.org/10.1016/0002-9610(75)90516-4)
- Mangram, A. J., Horan, T. C., Pearson, M. L., Silver, L. C., & Jarvis, W. R. (1999). Guideline for prevention of surgical site infection.
- Maris, P. (1995). Modes of action of disinfectants. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 14(1), 47–55.
- McCloskey, A., Gilmore, B., & Lavery, G. (2014). Evolution of Antimicrobial Peptides to Self-Assembled Peptides for Biomaterial Applications. *Pathogens*, 3(4), 791–821. <https://doi.org/10.3390/pathogens3040791>
- McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews from the American Society for Microbiology*. [https://doi.org/0893-8512/99/\\$04.00+0](https://doi.org/0893-8512/99/$04.00+0)

- Meason-Smith, C., Diesel, A., Patterson, A. P., Older, C. E., Mansell, J. M., Suchodolski, J. S., & Hoffmann, A. R. (2015). What is living on your dog's skin? Characterization of the canine cutaneous mycobiota and fungal dysbiosis in canine allergic dermatitis. *FEMS Microbiology Ecology*, 91(12), 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiv139>
- Micheel, V., Hogan, B., Köller, T., Warnke, P., Crusius, S., Hinz, R., Hagen, R. M., Schwarz, N. G. & Frickmann, H. (2015). Screening agars for MRSA: evaluation of a stepwise diagnostic approach with two different selective agars for the screening for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Military Medical Research*, 2(18). <https://doi.org/10.1186/s40779-015-0046-1>
- Miller, W. H., Griffin, C. E., & Campbell, K. L. (2013a). Bacterial Skin Diseases. In *Muller&Kirk's Small Animal Dermatology* (7th ed., pp. 184–222). Elsevier Saunders.
- Miller, W. H., Griffin, C. E., & Campbell, K. L. (2013b). Structure and Function of the skin. In *Muller&Kirk's Small Animal Dermatology* (7th ed., pp. 1–56). Elsevier Saunders.
- Misteli, H., Weber, W. P., Reck, S., Rosenthal, R., Zwahlen, M., Fueglistaler, P., Bolli, M. K., Oertli, D., Widmer, A. F. & Marti, W. R. (2009). Surgical Glove Perforation and the Risk of Surgical Site Infection. *Archive of Surgery, American Medical Association*, 144(6), 553–558.
- Mizukami, Y and Yokoyama, T. (1993). A study on the bactericidal activity of povidone-iodine. *Medical Electron Microscopy*, 26(2), 111–115.
- Morrison, D. C., & Ryan, J. L. (1987). Endotoxins and disease mechanisms. *Annual Review of Medicine*, 38, 417–432. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.38.020187.002221>
- Morton, H. E. (1950). the Relationship of Concentration and Germicidal Efficiency of Ethyl Alcohol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 53(1), 191–196. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1950.tb31944.x>
- Nahimana, I., Francioli, P., & Blanc, D. S. (2006). Evaluation of three chromogenic media (MRSA-ID , MRSA-Select and CHROMagar MRSA) and ORSAB for surveillance cultures of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Society of Clinical Infectious Diseases*, 12, 1168–1174. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01534.x>
- National Center for Biotechnology Information(a). PubChem Compound Database; CID=3776, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3776> (accessed April 24, 2017).

- National Center for Biotechnology Information(b). PubChem Compound Database; CID=410087, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/410087> (accessed April 20, 2017)
- National Center for Biotechnology Information(c). PubChem Compound Database; CID=702, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/702> (accessed April 24, 2017)
- Nelson, L. L. (2011). Surgical Site Infections in Small Animal Surgery. *Vet Clin Small Animal*, 41(5), 1041–1056. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2011.05.010>
- Newsom, B. (2008). Surgical wound infections: A historical review. *International Journal of Infection Control*, (1874), 8–10. <https://doi.org/10.3396/ijic.V4i1.002.08>
- NICE. (2008). Surgical site infections: Prevention and Treatment. *National Institute for Health and Clinical Excellence*, (October), 1–29.
- Osuna, D. J., DeYoung, D. J., & Walker, R. L. (1990). Comparison of Three Skin Preparation Techniques Part 2: Clinical Trial in 100 Dogs. *Veterinary Surgery*, 19(1), 20–23. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.1990.tb01137.x>
- Owens, C. D., & Stoessel, K. (2008). Surgical site infections: epidemiology, microbiology and prevention. *Journal of Hospital Infection*, 70(SUPPL. 2), 3–10. [https://doi.org/10.1016/S0195-6701\(08\)60017-1](https://doi.org/10.1016/S0195-6701(08)60017-1)
- Paulson, D. S. (2003). Introduction to Topical Antimicrobials and Their Applications. In D. S. Paulson (Ed.), *Handbook of topical antimicrobials: Industrial applications in consumer products and pharmaceuticals* (pp. 11–27). New York: Marcel Dekker, Inc.
- Perry, J. D., Davies, A., Butterworth, L. A., Hopley, L. J., Nicholson, A., & Gould, F. K. (2004). Development and Evaluation of a Chromogenic Agar Medium for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(10), 4519–4523. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.10.4519>
- Quinn, P., Carter, M., Markey, B., & Carter, G. (Eds.). (1993). Bacteriology. In *Clinical Veterinary Microbiology* (1st ed., pp. 118–126). London, United Kingdom: Elsevier Health Sciences, Mosby.
- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., FitzPatrick, E., Fanning, S., & Hartigan, P. (Eds.). (2011). *Staphylococcus* species. In *Veterinary Microbiology and Microbial Disease* (2nd ed., p. 470). Chichester, United Kingdom: Wiley-Blackwell (an imprint of John Wiley & Sons Ltd).
- Rackur, H. (1985). New aspects of mechanism of action of povidone-iodine. *Journal of Hospital Infection*, 6, 13–23.

- Renberg, W. C. (2011). Preparation of the Patient, Operating Team, and Operating Room for Surgery. In K. M. Tobias & S. A. Johnston (Eds.), *Veterinary Surgery Small Animal* (1st ed., pp. 164–169). St. Louis: Elsevier Saunders.
- Rochat, M., Mann, F., & Berg, J. (1993). Evaluation of a one-step surgical preparation technique in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association.*, 203(3), 392–395.
- Rutala, W., Weber, D. J., & HICPAC. (2008). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities , 2008.
- Sasaki, T., Kikuchi, K., Tanaka, Y., Takahashi, N., Kamata, S., & Hiramatsu, K. (2007). Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2770–2778. <https://doi.org/10.1128/JCM.00360-07>
- SCENIHR. (2009). Assessment of the Antibiotic Resistance Effects of Biocides. *Directorate-General for Health&Consumers, Scientific Committees, European Commission.* <https://doi.org/10.2772/8624>
- Seal, L. A., & Paul-Cheadle, D. (2004). A systems approach to preoperative surgical patient skin preparation. *American Journal of Infection Control*, 32(2), 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2003.11.001>
- Segal, C. G., & Anderson, J. J. (2002). Preoperative skin preparation of cardiac patients. *AORN Journal*, 76(5), 821–8.
- Sidhwa, F., & Itani, K. M. F. (2015). Skin preparation before surgery: options and evidence. *Surgical Infections*, 16(1), 14–23. <https://doi.org/10.1089/sur.2015.010>
- Singh, A., Walker, M., Rousseau, J., & Weese, J. S. (2013). Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. *BMC Veterinary Research*, 9, 93. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-93>
- Stull, J. W., & Weese, J. S. (2015). Hospital-Associated Infections in Small Animal Practice. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 45(2), 217–233. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.11.009>
- Turk, R., Singh, A., & Weese, J. S. (2015). Prospective Surgical Site Infection Surveillance in Dogs. *Veterinary Surgery*, 44(1), 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2014.12267.x>
- Verwilghen, D., & Singh, A. (2015). Fighting Surgical Site Infections in Small Animals. Are We Getting Anywhere? *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 45(2), 243–276. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2014.11.001>

World Health Organization. (2009). WHO Guidelines for Safe Surgery 2009. *Guidelines for Safe Surgery*. <https://doi.org/January 13, 2013>

World Health Organization. (2016). Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection. *Global Guidelines for the Prevention of Surgical Site Infection*.

ANEXOS

**ANEXO I – CASUÍSTICA DESCRIMINADA NOS SERVIÇOS DE MEDICINA INTERNA, CIRURGIA,
IMAGIOLOGIA E MEDICINA PREVENTIVA**

Patologia Médica					
Especialidade	Patologia	Cão	Gato	Outro	Totais
Cardiologia	Insuficiência Cardíaca Congestiva	8	1		9
	DDMVM	6	2		8
	PDA	1			1
	Dirofilariose	1			1
	Fibrilhação Atrial	2			2
	HTA consequente de DRC		1		1
	Paragem Cardio-Respiratória	2	1		3
	Derrame Pericárdio Idiopático	1			1
Cirurgia	Pré-operatório		4		4
	Pós-operatório	15			15
Comportamento	Ansiedade Separação	1			1
	Agressividade por impulso-controlo	1			1
Dermatologia	Imunoterapia	1			1
	Malasseziose	2			2
	Demodecose	2			2
	Sacoptose	1			1
	Otite inflamatória	1			1
	Otite malassezia	5			5
	Otite bacteriana	6			6
	Abcessos cutâneo	2			2
	DAPP	2			2
	Doença auto-imune muco-cutânea	2			2
	Piodermatite	1			1
	Epitelioma Sebáceo	1			1
	Dermatite Atópica	1			1
	Pododermatite	1			1
	Pododermatite fúngica	1			1
	Pústulas assépticas	1			1
	Dermatite Fúngica			2	2
	Alopécia diluição cor	1			1
Endocrinologia	Hiperadrenocorticismo	1			1
	Hipoadrenocorticismo	4			4
	Hipertiroidismo		6		6
	Hipotiroidismo	4			4
	Diabetes <i>mellitus</i>	1	2		3
	Diabetes <i>insipidus</i>	1			1
	Hiperparatiroidismo 2º	1	1		2
Gastroenterologia	Pancreatite	5	5		10
	Giardiose	1			1
	Diarreia crónica	2			2
	Gastroenterite por intolerância alimentar	2	1		3
	Fecaloma	1			1
	Fecaloma parasitário	1			1
	Gastrite crónica	3			3
	Gastrite tóxica	3			3
	Rotura Glândulas perianais	1			1
	Malformação ano-rectal	1			1
	Gastroenterite hemorrágica	2			2
	Gastroenterite etiologia desconhecida	8			8
	Enterite histiocítica	1			1
Colite	4			4	

	Corpo Estranho Linear		1		1
	IBD	2			2
	Corpo Estranho TGI	2			2
	Megaesófago	1			1
	Torção de estômago	1			1
	Impactação cecal			1	1
Hematologia	Anemia hemolítica imunomediada	5			5
Urinário	Cistite Idiopática		2		2
	Doença Renal Crônica	11	13		24
	Obstrução (FLUTD)	1	6		7
	Oligúria indeterminada		1		1
	Infeção Trato Urinário	1			1
	Incontinência Urinária	1			1
	Litíase		1		1
Oftalmologia	Úlcera córnea	1			1
	Conjuntivite	4	1		5
	Cherry-eye	2			2
	Úlcera melting	1	1		2
	Hifema	2	1		3
	Prolapso íris	1			1
	Laceração córnea	1			1
	Queratoconjuntivite seca	1	1		2
	Traumatismo	1	0		1
	Entrópion	2			2
Ortopedia	Traumatismo	9	2		11
	Displasia de anca	12			12
	Doença Degenerativa articular	3			3
	Claudicação	5			5
	Luxação Patela	5	1		6
	Osteomielite	1	1		2
	Displasia do cotovelo	2			2
	Osteodistrofia hipertrófica	1			1
	RLCA	4			4
Oncologia	Hemangiossarcoma	6			6
	Lipoma	2			2
	Carcinoma	3			3
	Hematoma	1			1
	Osteossarcoma	2			2
	Neoplasia Testicular	1			1
	Neoplasia mamária	4	1		5
	Mastocitoma	5			5
	Sarcoma células redonda	1			1
	Linfoma	2	3		5
	Colesteatoma	1			1
	Feocromocitoma	1			1
	Carcinoma espinho celular	2			2
	Adenoma Gl. Hepatóides	1			1
	Fibrossarcoma		2		2
Odontologia	Gengivo-estomatite		8		8
	Granuloma piogénico		3		3
	Hiperplasia gengival	1			1
	Úlcera língua		1		1
	Estomatite juvenil		1		1
Reprodução	Orquite tóxica	1			1
	Criptorquidismo	1			1
	Piometra	9	4		13
	HBP	1			1
	Split heat	1			1

	Pseudogestação	2			2
	Carcinoma espinho celular do prepúcio	1			1
	Balanopostite	1			1
Infecto-contagiosas	Borreliose	1			1
	Leptospirose	5			5
	MRSP	1			1
	Coriza		2		2
	Calicivirose		7		7
	Parvovirose	3	2		5
	Leishmaniose	4			4
	Mycoplasma		1		1
	FIV		4		4
	FeLV		4		4
	Dirofilariose	2			2
	Tosse do Canil	3			3
	<i>T. Pityocampa</i>	2			2
	Hemoparasitas	1	1		2
	Esgana	2			2
	<i>Mycobacterium</i>		1		1
	Neurologia	Hérnia vertebral	13		
Parésia dos Posteriores		1	1		2
Epilepsia		5			5
Esclerose vertebral			1		1
Síndrome Vestibular Geriátrico		2			2
Discoespondilite		1			1
Sub-totais		295	103	3	401

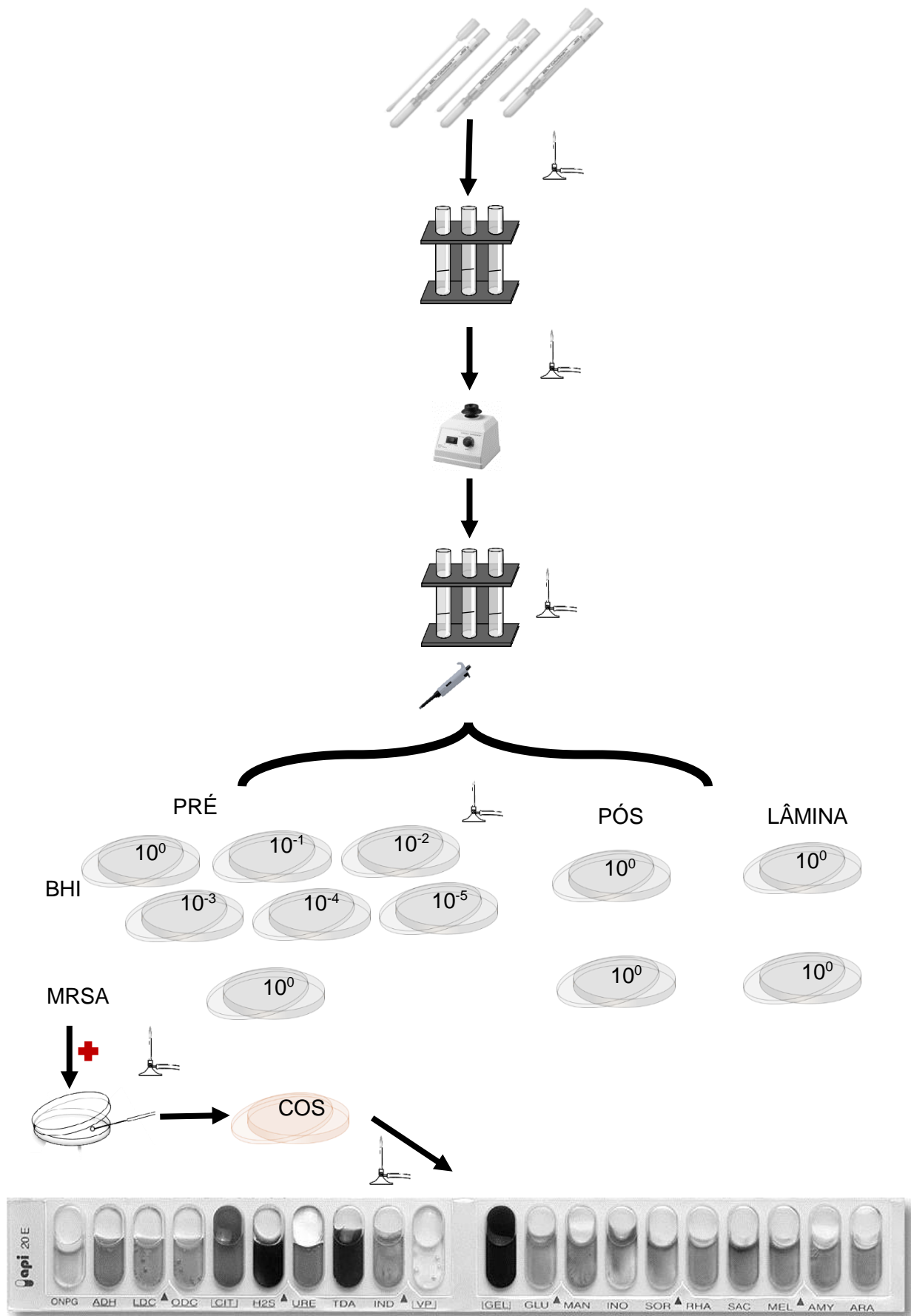
Patologia Cirúrgica					
Especialidade	Patologia	Cão	Gato	Outro	Total
Cardiologia	PDA	1			1
Dentistria	exodontia	2	7	2	11
	Destartarização	6	3		9
Gastrenterologia	Corpo Estranho	2	2		4
	Mucocelo VB	1			1
	Esofagostomia		4		4
	Enterectomia	1			1
	Torção Gástrica	4			4
Reprodução	Biópsia prostática	1			1
	Cesareana	4	1		5
	Mastectomia	5	2		7
	OVH	11	8	2	21
	OVH piometra	6	2		8
	Orquiectomia	6	5		11
Oftalmologia	Quisto MN	1			1
	Enucleação		1		1
Ortopedia	eversão joelho	1			1
	Luxação patela	5			5
	RLCC	2			2
	Receção Cabeça Fémur	1			1
	Artrodese tarso-metatarsica	1			1
	Amputação membro		2		2
	Amputação cauda		1		1
	Fratura	3			3
Neurologia	Ventral slot	5			5
	Hemilaminectomia	10			10
Urínario	Carcinoma células transição Bexiga	1			1
	Cistotomia	2		1	3

	SUB		2		2
	Litíase	2	3		5
Outras	Encerramento do Palato	2			2
	Esplenectomia	5			5
	Extração anéis traqueais	1			1
	Hemimaxilectomia	2	2		4
	Mastocitoma	5			5
	Nodulectomia	8			8
	Otohematoma	2			2
	Pólipo Nasofaríngeo		1		1
	Quisto queratina	1			1
	Traqueostomia	1			1
Sub-totais		111	46	5	162

Exames Complementares					
Especialidade	Patologia	Cão	Gato	Outro	Total
Raio X		26	14		40
TAC		10	5		15
Ecografia Abdominal		27	13		40
Ecocardiografia		13	6		19
PAAF		12			12
		88	38		126

Medicina Preventiva					
Especialidade	Patologia	Cão	Gato	Outro	Total
Vacinação	Pentavalente	9			9
	Tetravalente		3		3
	Trivalente		6		6
	Bivalente	4		2	6
	Monovalente	10			10
Microchip		6			6
Desparasitação	Interna	4	2		6
	Externa	5	2		7
Sub-totais		38	13	2	53

ANEXO II – ESQUEMA DO PROTOCOLO EXPERIMENTAL LABORATORIAL (ORIGINAL)



Brain heart infusion broth
Code 84626.0500
Also known as

BHI, BHI broth

Intended use

For the cultivation of fastidious and non-fastidious microorganisms.

Formula - Composition in g/L

Brain infusion solids.....	12.5
Beef heart infusion solids.....	5.0
Peptones.....	10.0
Glucose.....	2.0
Sodium chloride.....	5.0
Sodium hydrogen phosphate.....	2.5

* Adjusted and/or supplemented as required to meet performance criteria

Final pH 7.4 ± 0.2 at 25 °C.

Instructions for preparation

Dissolve 37 g in 1 litre of purified water, by heating if necessary. Dispense the medium into flasks or tubes of suitable capacity. Sterilise in the autoclave at 121 °C for 15 minutes.

Principle of the method and general information

Brain heart infusion broth is a highly nutritious general-purpose growth medium for culturing fastidious and non-fastidious microorganisms, such as streptococci, pneumococci, meningococci, moulds and yeasts. Brain heart infusion broth was first described by Rosenow. He prepared a rich medium for culturing streptococci by combining dextrose broth and brain tissue. Hayden modified the original formula while working with dental pathogens. The current formula is a modification of Rosenow and Hayden media. Brain heart infusion broth can be supplemented with antibiotics, varying amounts of sodium chloride, yeast extract, and serum to provide a rich medium for bacteria, yeasts and pathogenic fungi.

Brain heart infusion broth is recommended for the preparation of the culture of *Saureus* to be used for coagulase test.

Instruction for use

For laboratory use only.
The experimental procedure depends on the purpose for which the medium is used. Refer to the various compendia for the details of the procedures.

Limitations

It is recommended that biochemical and/or serological tests be performed on pure culture for complete identification of cultivated microorganisms.

Quality Control
Physical characteristics:

 Appearance of powder
Appearance of prepared medium
pH (25 °C)

 Beige, fine, homogeneous, hygroscopic powder
Brown, limpid
7.4±0.2

WWR International Ltda/ajp1
Rua Carlos de Campos, 2200/3
Cidade Industrial de Jundiaí
B-3001 Jundiaí - SP - Brasil
Tel: +52 (0) 16 385 0111

1 / 2

Revision: TS-446260500-000X rev. 0 - 02-2013

Microbiological characteristics:

Test strains	Inoculation method	Inoculation method	Growth characteristics	Productivity
<i>S. aureus</i> ATCC 29824	37 °C/24 h/AE	DE	Good growth	DDI 5.1
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19619	37 °C/24 h/AE	DE	Good growth	DDI 5.1
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 6301	37 °C/24 h/AE	DE	Good growth	DDI 5.1
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	37 °C/24 h/AE	DE	Good growth	DDI 5.1
<i>N. gonorrhoeae</i> CG 8073	37 °C/24 h/AE	DE	Good growth	DDI 5.1
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	37 °C/24 h/AE	DE	Good growth	DDI 5.1
<i>A. baumannii</i> ATCC 19604	25 °C/24 h/AE	DE	Good growth	DDI 5.1

Notes:
DCC: - Highest dilution showing growth on reference culture medium (RB) - highest dilution showing growth on culture medium under test (TB) (considering the index as positive value, e.g. 10⁻⁶ %)
*Target organisms: DCC 1 - (the growth on TB shall be not more than 1 dilution lower than RB)
Inoculation atmosphere: AE: aerobic incubation
Incubation temperature: 37 °C
Inoculum: Type Culture Collection: CB strain obtained from Laboratory culture collection
A/C: 1 - 1 (optimal test time in minutes)

References

- Rosenow, E. C., 1919. Studies on elective localization. J. Dent. Research 1:205-249.
- Hayden, R. L., 1923. Elective localization in the eye of bacteria from infected teeth. Arch. Int. Med. 32:828-849

Storage conditions

For laboratory use only. Keep tightly closed, away from bright light, in a cool dry place (+10 °C to 30 °C and <60% RH).

Ordering information

Brain heart infusion broth

Bottle of 500 g

ANEXO III – INDICAÇÕES DO FABRICANTE PARA O MEIO BHI AGAR

ANEXO IV – INDICAÇÕES DO FABRICANTE PARA O MEIO MRSA AGAR CROMOGENICO



MRSA AGAR BASE, MODIFIED CHROMOGENIC

CAT Nº: 1498

For the detection and differentiation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*

FORMULA IN g/l

Growth Factors	56,00	Chromogenic Mixture	0,24
Peptone Mixture	41,00	Bacteriological Agar	12,50
Final pH 7,0 ± 0,2 at 25°C			

PREPARATION

Suspend 110 grams of the medium in one liter of distilled water. Mix well and dissolve by heating with frequent agitation. Boil for one minute until complete dissolution. AVOID OVERHEATING. DO NOT AUTOCLAVE. Cool to 45-50°C and aseptically add two vials of Cefoxitin Supplement (Cat. 6069) reconstituted in 5 ml of sterile distilled water. Homogenize gently and dispense into Petri dishes. The prepared medium should be stored at 8-15°C. The color is amber, slightly opalescent.

The dehydrated medium should be homogeneous, free-flowing and grey straw in color. If there are any physical changes, discard the medium.

Cefoxitin MSA Supplement (Cat. 6069)

(1 vial for 500 ml of the medium)
Cefoxitin..... 2 mg

USES

MRSA AGAR BASE, MODIFIED, is a chromogenic medium for the detection and differentiation of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*.

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA, are of particular interest at an international level due to its virulence and resistance to multiple antibiotics. The antimicrobial resistance is a serious threat to public health as it is now regarded as a major hospital acquired disease worldwide. The important changes observed in the epidemiological and microbiological characteristics of the infections caused by *Staphylococcus aureus* are the reason for the increment and prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* nosocomial (associated to hospitalized patients) and the proliferation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* acquired by the community. The MRSA continues being a serious problem in many healthcare centres; more than 50% of the *Staphylococcus aureus* obtained are from Intensive Care Units (ICU) and close to 40% are from hospital patients. Effective, rapid laboratory diagnosis and susceptibility testing is critical in treating, managing and preventing MRSA infections.

Inoculate and incubate at 35±2°C for 24-48 hours. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* grow as magenta colonies. Methicillin resistant *Staphylococcus epidermidis* grow as green-blue colonies. The rest of the accompanying flora is inhibited.

MICROBIOLOGICAL TEST

The following results were obtained from type cultures in the performance of the medium, with the respective supplements added, after incubation at a temperature of 35± 2°C during 24-48 hours.

1

LABORATORIOS CONDA, S.A.

www.condalab.com



Microorganisms	Growth	Colony Color
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Inhibited	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 43300	Good	Magenta
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	Good	Blue-green
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibited	-

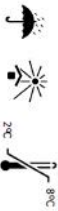
BIBLIOGRAPHY

Hutchison, M.J., Edwards, G.F.S., Morrison, D. Evaluation of chromogenic MRSA Reference Laboratory presented at the 2005 Institute of Biomedical



STORAGE

Once opened keep powdered medium closed to avoid hydration.



2

LABORATORIOS CONDA, S.A.

www.condalab.com