



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

IVANY MACHADO DE CARVALHO BAPTISTA

**IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS DA CAVIDADE BUCAL
NO LAVADO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES SOB
VENTILAÇÃO MECÂNICA**

2014

IVANY MACHADO DE CARVALHO BAPTISTA

**IDENTIFICAÇÃO DE PATÓGENOS DA CAVIDADE BUCAL NO LAVADO
BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Tese apresentada ao curso de odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA, Especialidade Endodontia.

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

São José dos Campos

2014

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos
Campos: ICT/UNESP; 2013.

B229i Baptista , Ivany Machado de Carvalho
Identificação de patógenos da cavidade bucal no lavado broncoalveolar de
pacientes sob ventilação mecânica / Ivany Machado de Carvalho Baptista. - São
José dos Campos: [s.n.], 2014.
108 f. : il.

Tese (doutorado em Odontologia restauradora) – Instituto de Ciência e
Tecnologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2014.

Orientador: Profa Tit. Márcia Carneiro Valera

Co-Orientador: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho

1. Bactéria. 2. Cavidade Oral. 3. Lavado Broncoalveolar. 4. Pneumonia
Associada a Ventilação Mecânica. 5. Unidade de Terapia Intensiva. 6. Método
Checkerboard. I. Valera, Márcia Carneiro. II. Instituto de Ciência e Tecnologia
de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. III. Universidade
Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". IV. UNESP – Univ Estadual
Paulista. V. Título

tD17

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do
Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 02 de Julho de 2014

E-mail: ivanybaptista@uol.com.br

Assinatura: _____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera (Orientadora)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Adjunto Carlos Henrique Ribeiro Camargo

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Prof. Adjunto Claudio Antonio Talge Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP – Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa Dra Maria Cristina Chavantes

Faculdade de Medicina Universidade Nove de Julho UNINOVE

Profa Dra Suely Itzuko Ciosak

Departamento de Enfermagem
Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo EEUSP

São José dos Campos, 02 de julho de 2014.

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, Fabio Roberto da S. Baptista, amigo, companheiro, meu porto seguro, meu grande amor. Sempre me apoiando e incentivando, me fazendo acreditar que eu posso conquistar tudo que desejar, saiba que minha maior conquista sempre foi e será você! Te amo para sempre!

Aos meus filhos queridos, Fabio S. Baptista Junior e Felipe Machado de Carvalho S. Baptista, só posso acreditar que meu esforço seja um bom exemplo para vocês, agradeço a paciência e incentivo em tudo que faço nessa vida! Amo vocês demais!

À minha mãezinha querida, Silene Machado, seguramente cada passo que dou é guiado por ela em suas orações e a cada ausência minha, ela esteve sempre presente, cuidando dos netos, do genro e da casa, com todo carinho do mundo “mãe sem você nada seria possível! Te amo!

À toda minha família, irmãos sobrinhos, especialmente à minha querida irmã, Carla Andrea de Carvalho Kabbach e ao meu pai, Ivan Assis de Carvalho, que mesmo distantes se mantêm presentes na minha história e conquistas.

AGRADECIMENTOS

À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do vice-diretor Prof.Dr. Estevao Tomomitsu Kimpara.

A minha querida orientadora Profa Tit. Marcia Carneiro Valera, que com seu olhar sensível me enxergou e com sua visão empreendedora e interdisciplinar me possibilitou ser sua aluna e orientada, o que para mim é uma honra. Agradeço o aprendizado e o convívio, sua fé me faz acreditar que com persistência e dedicação os obstáculos podem ser transponíveis e assim minha admiração pela mulher e profissional exemplar que é, cresce a cada dia. A amizade em momentos felizes é muito fácil e prazerosa, mas são nos momentos difíceis que reconhecemos o valor da verdadeira amizade, poder compartilhar de sua amizade, seu extremo conhecimento e sua humildade me faz acreditar que tudo é possível ser feito e bem feito. Muito obrigada!

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Frederico Canato Martinho, agradeço por sua chegada e enorme contribuição, certamente seu empenho, dinamismo, inteligência e carisma me motivaram a seguir em frente.

Ao Chefe de Departamento de Odontologia Restauradora, Profa. Dra. Maria Filomena Rocha Lima Huhtala, participativa atenciosa e competente.

Aos Professores do Programa de Pós Graduação em Odontologia Restauradora, em especial à especialidade Endodontia.

Ao Prof. Adjunto Carlos Henrique Ribeiro Camargo, sensato, humano, exemplo de cirurgião dentista e grande pesquisador na área da endodontia.

Ao Prof. Dr. Claudio Antonio Talge Carvallho, com carinho e dedicação inspira os jovens alunos que buscam o aperfeiçoamento e atuação em pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Bruno das Neves Cavalcanti, contribuição exemplar para todos os alunos que sonham em fazer pesquisa.

À Profa. Dra. Ana Paula Martins Gomes, com toda simpatia e atenção sempre pronta a elucidar dúvidas e contribuir para o aprendizado.

À Profa. Dra. Maria Amélia Maximo de Araujo, me recebeu com carinho e atenção que dispensa aos alunos.

Ao Prof. Dr. Eduardo Bressiani, de forma generosa contribuiu muito, com suas excelentes observações durante o Exame Geral de Qualificação.

Ao Professor Adjunto Jose Roberto Rodrigues, me envolveu pelos caminhos da educação e ensino.

Ao Prof. Ivan Balducci, por seus ensinamentos em Bioestatística.

À Profa. Suely Carvalho Mutti Naressi, exímia conhecedora da Bioética.

Ao MSC e doutorando Gustavo Giacomelli Nascimento, da Universidade Federal de Pelotas, que muito colaborou com as análises estatísticas desta pesquisa.

Às colegas que concluíram o doutorado neste programa:

À Dra. Liliam Eiko Maekawa colega e exemplo a ser seguido.

À Dra. Sylvia Bicalho Rabelo profissional exemplar, competente e generosa.

À Dra. Aletéia Fernandes, me envolveu com sua atenção e amizade.

Aos Professores da Biopatologia Bucal Área Microbiologia/Imunologia.

À Profa. Adjunta Cristiane Yumi Koga Ito, sensível e inteligente, me recebeu com carinho e atenção e me indicou os caminhos a prosseguir em minha pesquisa, contribuiu muito com suas observações no Exame Geral de Qualificação.

À Profa. Adjunta Juliana Campos Junqueira, elucidou o início da metodologia.

Ao Prof. Tit. Antonio Olavo Cardoso Jorge, que me recebeu no PROAC.

Aos professores componentes externos da Banca Examinadora.

À Profa. Dra. Maria Cristina Chavantes minha incentivadora, amiga, um exemplo e inspiração, que coloca as pessoas como objetivo maior dos benefícios da ciência.

À Profa. Dra. Suely Itsuko Ciosak Enfermeira atuante e empreendedora, sempre à frente de seu tempo, não mede esforços para oferecer o melhor no cuidado aos pacientes e na formação de novos profissionais.

À Profa. Dra. Edna Aparecida Moura Arcuri, profissional admirável e incansável, um exemplo a ser seguido.

À Profa. Dra. Rita de Cássia Gengo e Silva, pela atenção de sempre e competência.

À Universidade de Guarulhos, Profa. Dra. Magda Feres, Profa. Dra. Luciene Cristina de Figueiredo e Bióloga Izilvania Barreto, por me permitirem utilizar o laboratório da UNG, pela ajuda e atenção.

Aos pacientes e familiares que consentiram para a realização dessa pesquisa.

Ao Hospital POLICLIN e sua direção que permitiu que os dados fossem coletados nesta excelente Instituição de Saúde.

Ao Diretor Clínico do Hospital POLICLIN, Dr. Carlos Eduardo da Rocha Santos, que tanto contribuiu com sua vivência e expertise.

Ao Presidente do Instituto Policlin de Ensino de Pesquisa do Hospital POLICLIN Dr. Sylvio José Macedo Becker, por sua permissão para realização da pesquisa.

Ao Diretor de Ensino e Pesquisa do Instituto Policlin de Ensino de Pesquisa, Dr. João Manoel Theotônio dos Santos, pelo incentivo a pesquisa científica.

À equipe de Enfermagem do Hospital POLICLIN.

À Gerente de Enfermagem Enfermeira Iara Derrico, sensível e competente.

À Coordenadora de Enfermagem da UTI Enfermeira Érika Bordini e toda sua equipe que muito me ajudaram para realização da pesquisa.

Às Enfermeiras: Cristiane Martins, Tássia Jourdan. Gisele Louredo, Simone Redicopa, Juliana Teixeira Nunes Vidal, competentes e comprometidas.

À equipe de fisioterapia da UTI do Hospital POLICLIN.

À Coordenadora Fisioterapeuta Carmem Dutra e Fisioterapeuta Danielle Monteiro e equipe da UTI, muito me ajudaram nas coletas das amostras.

Aos Colegas e alunos da endodontia especialmente os que iniciaram comigo:

Ana Claudia Xavier dinâmica, inteligência rápida, executora primorosa, adorei aprender ao seu lado.

Camila Said meiga, receptiva e perspicaz, um grande exemplo para mim.

Claudia Vilella Bin competente, carinhosa e um primor a ser seguido.

Flavia Cardoso perfeccionista em tudo que faz, não mediu esforços para compartilhar seu conhecimento.

Gleyce Oliveira Silva envolvente, inteligente e sempre disposta a ajudar.

Marcella Pavanello, carinhosa e participativa.

Nádia Ferreira excelente profissional, reuni tudo o que uma jovem e talentosa pesquisadora necessita, contribuiu e muito em minha pesquisa.

Rafaela Vasconcelos determinada, competente e talentosa, soube dividir comigo seus conhecimentos.

Sarah Coelho meiga, primorosa e atenciosa.

Tereza Pedrosa, dinâmica, inteligente e intensa me conquistou desde o iniciou com sua firmeza e dedicação.

Guilherme Rodrigues Teodoro, jovem e inteligente pesquisador.

Michelle Peneluppe Silva, companheira de estágio na microbiologia.

Aos alunos do Mestrado, também contribuíram com meu aprendizado:

Flavia Teixeira, Flávia Martins Leal, Emanuel Rovai, Luciana Correa Ferreira, Monique Costa Moreira, Rafael Binato Junqueira e Rose Soares, jovens inteligentes, comprometidos e determinados.

Às Funcionárias do Departamento de Endodontia, Rosangela da Silva de Melo, Josiana Maria Alves Carneiro e Fernanda Maria de Brito Cunha, pelo acolhimento e atenção, competentes e dedicadas.

Aos Técnicos do laboratório de microbiologia, Sergio Giovanny Alves e Domingos, que me receberam com muita atenção.

À Equipe da Sessão Técnica de Pós-graduação:

Rosemary de Fátima Salgado, Bruno Shiguemitsu Marques Tanaka e Ivan Oliveira Damasceno, sempre dispostos a esclarecer minhas dúvidas.

“Minha fé nunca se abalará, pois em meu coração habita Deus, que é responsável por tudo e me dá a força necessária, para prosseguir meu caminhar pela vida”

Ivany Machado de Carvalho Baptista

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAL	= Lavado Broncoalveolar
HO	= Higiene Oral
IOT	= Intubação Orotraqueal
mini-BAL	= Mini Lavado Bronco-Alveolar
PSB	= Escovado Broncoscópico Protegido
PAVM	= Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica
TOT	= Tubo Oro Traqueal
UTI	= Unidade de Terapia Intensiva
VMI	= Ventilação Mecânica Invasiva

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica.....	18
2.2 Higiene Oral.....	23
3 PROPOSIÇÃO.....	28
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1 Fase Clínica.....	29
4.1.1 Procedimentos Clínicos e seleção de Pacientes.....	29
4.1.2 Coleta das Amostras.....	30
4.1.3 Coleta das Amostras da Cavidade Oral.....	32
4.1.4 Coleta do lavado broncoalveolar.....	33
4.2 Fase Laboratorial.....	38
4.2.2 Análise Microbiológica por Checkerboard DNA-DNA Hybridization.....	39
4.2.3 Colocação da Amostras na Membrana de Nylon.....	40
4.2.4 Hibridização da membrana com as Sondas de DNA.....	42
4.2.5 Detecção das Espécies.....	46
4.3 Análise Estatística.....	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Perfil da amostra.....	49

5.2 Identificação da carga bacteriana das sondas de DNA.....	49
5.3 Identificação das espécies bacterianas e hemocultura Positiva.....	60
6 DISCUSSÃO.....	61
7 CONCLUSÃO.....	71
8 REFERÊNCIAS.....	73
APÊNDICES.....	80
ANEXOS	108

Baptista IMC. Identificação de patógenos da cavidade bucal no lavado broncoalveolar de pacientes sob ventilação mecânica [tese]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

Pacientes críticos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), em sua maioria, requerem auxílio da Ventilação Mecânica Invasiva (VMI). A análise da diversidade microbiana é fundamental para identificação de espécies, ainda desconhecidas, responsáveis pela Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAVM). Os objetivos deste estudo foram: a) Estudar a diversidade microbiana presente na cavidade oral e no BAL (mini-BAL) de pacientes internados em UTI sob VMI, através da técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization; b) Avaliar se o perfil microbiano presente na cavidade oral está presente no Lavado Bronco Alveolar (mini-BAL), em diferentes períodos de tempo da VMI (12 h, 48 h, 96 h) e na extubação; c) Detectar a presença de espécies bacterianas circulantes na corrente sanguínea de pacientes internados em UTI sob VMI através dos resultados de hemocultura. Participaram do estudo 10 pacientes críticos internados em UTI sob VMI. As amostras foram coletadas no dorso da língua, espaço subgengival, no BAL, no aspirado endotraqueal e cânula de intubação orotraqueal. Foi possível identificar a presença de espécies bacterianas no BAL/aspirado endotraqueal, inclusive com aumento da carga bacteriana com o tempo prolongado de Intubação orotraqueal (IOT), 48 h e 96 h; e em relação à mucosa oral e espaço subgengival também foi possível observar já nas primeiras 12 h a presença de espécies bacterianas no BAL, estes achados apresentaram associação com PAVM e com resultados de hemocultura positiva. As bactérias isoladas na hemocultura foram *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*. Houve associação de febre com PAVM e hemocultura positiva. Concluiu-se que durante a IOT, espécies bacterianas migram rapidamente para as vias aéreas inferiores, podendo contribuir para a fisiopatogenia da PAVM, houve associação de PAVM com *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemella morbillorum*, *Neisseria mucosa*, *Propionibacterium*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Treponema denticola*, *Treponema socransckii*, *Veillonella parvula* e não houve associação entre PAVM e hemocultura positiva.

Palavras-chave: Bactéria. Cavidade Oral. Lavado Broncoalveolar. Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica. Unidade de Terapia Intensiva. Método Checkerboard.

Baptista IMC. Identification of pathogens of oral cavity in bronchoalveolar lavage of patients under invasive mechanical ventilation [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2014.

ABSTRACT

*Critical patients admitted to intensive care unit (ICU), in their majority, require Invasive Mechanical Ventilation assistance (MV). The analysis of microbial diversity is fundamental to identifying species, as yet unknown, responsible for Pneumonia associated with mechanical ventilation (VAP). The objectives of this study were: to Study microbial diversity) present in the oral cavity and in the BAL (mini-BAL) of patients hospitalized in ICU under VM by Checkerboard DNA-DNA Hybridization technique; b) assess whether the microbial profile present in the oral cavity is present in Broncho Alveolar (mini-BAL), in different time periods of the MV (12 h, 48 'h, 96 h) and on extubation; c) detect the presence of bacterial species circulating in the bloodstream of patients hospitalized in ICU under VM through the results of blood cultures. Participated in this study 10 critical patients admitted to ICU under MV. The samples were collected on the dorsum of the tongue, subgingival space, in BAL, endotracheal aspirate and orotracheal intubation cannula. It was possible to identify the presence of bacterial species in the BAL/endotracheal aspirate, including with increased bacterial load with the extended time of orotraqueall Intubation (OTI), 48 h and 96 h; and in relation to the oral mucosa and subgingival space has also been possible to observe in the first 12 h the presence of bacterial species in the BAL, these findings showed association with VAP and with positive blood culture results. The isolated bacteria in blood culture were *S auerus*, *S epidermides*, *P aeruginosa*. There was association with fever and blood culture positive PAVM. It was concluded that during the OTI, bacterial species migrate quickly to the lower airways and may contribute to the pathophysiology of VAP. There were associations between VAP and *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemella morbillorum*, *Neisseria mucosa*, *Propionibacterium*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, *Veillonella parvula* and there was no association between VAP and blood culture positive.*

Keywords: Bacteria. Oral cavity. Bronchoalveolar lavage. Ventilator-associated pneumonia. Intensive Care Unit. Checkerboard Method.

1 INTRODUÇÃO

Pneumonia é a segunda infecção hospitalar mais comum e a principal causa de mortalidade entre as infecções adquiridas em ambiente hospitalar. A aspiração de microrganismos da orofaringe para o trato respiratório inferior, seguida pela proliferação bacteriana e invasão do parênquima, constitui a via mais importante de desenvolvimento de pneumonias associadas à ventilação mecânica. Podendo ainda estar associada a inalação de aerossóis contaminados ou, menos frequentemente, por disseminação hematogênica originada de um foco à distância (Cavalcanti *et al.*, 2005; Cutler, Davis, 2005).

Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAVM) é caracterizada pelo desenvolvimento da infecção pulmonar a partir de 48 h da Intubação Orotraqueal (IOT) e Ventilação Mecânica Invasiva (VMI), até 48 h após a extubação. Em pacientes críticos internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) com IOT e VMI, a incidência de PAVM está acima de 78% e o índice de mortalidade varia entre 24% - 76% dependendo da população estudada e da técnica utilizada para o diagnóstico da pneumonia. Estes números impressionam, e ainda podem se elevar quando associados aos fatores de risco como, baixa imunidade, antibioticoterapia prolongada, e comprometimento da mucosa oral em pacientes intubados (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007; Beraldo, Andrade, 2008).

Diferentes são as vias de infecção propostas na literatura para PAVM, dentre elas, a aspiração da microbiota orofaríngea. Aspiração de secreções do trato respiratório superior é facilitada pela infiltração de secreções em volta do tubo traqueal, comprometido pela deglutição e posição supina do paciente. O acesso de patógenos pela corrente sanguínea, seja a partir de cateteres, seja por translocação bacteriana a

partir do trato gastrointestinal, também deve ser considerado (Weber *et al.*, 2007).

A etiologia da PAVM é variável, dependendo ainda, do tempo de estabelecimento, duração de hospitalização, população estudada e conduta hospitalar. Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007, analisaram os microrganismos da cavidade oral e BAL, utilizando o método molecular clonagem e sequenciamento e identificou que entre os microrganismos de maior incidência destacam-se: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Haemophilus influenzae* que são predominantes no estágio inicial da PAVM. Bactérias Gram-negativas aeróbias, incluindo espécies de enterobactérias (família das *Enterobacteriaceae*), são relatadas tanto no estágio inicial quanto em estágio avançado da doença. *Pseudomonas aeruginosa*, e espécies pertencentes aos gêneros *Acinobacter* e *Enterobacter* são mais frequentes apenas nos estágios mais avançados. No pós-operatório de pacientes politraumatizados, *H. influenzae* e *S. pneumoniae* são predominantes (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007).

Em Revisão de literatura, Paju e Scanapeico (2007), verificaram importante papel de bactérias orais nas infecções respiratórias sugerindo que patógenos presentes na cavidade oral, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Mycoplasma pneumoniae*, colonizam o trato respiratório inferior.

Brennam *et al.* (2004), em revisão de literatura, revelaram semelhança, entre microrganismos colonizadores da cavidade oral e dos pulmões. Entre as espécies bacterianas da cavidade oral, as mais comumente encontradas em PAVM, incluem bacilos Gram-negativos, tais como, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacteriaceae*, e cocos gram-positivos, principalmente *Staphylococcus aureus*.

Segundo Beraldo e Andrade (2008), em revisão integrativa de literatura descreve que, após a intubação a microbiota oral, sofre alterações, aumento de microrganismos e formação de biofilme a partir de 48hs. Bactérias Gram-negativas são frequentemente isoladas tanto no

biofilme dental, quanto na secreção pulmonar e este biofilme é constituído por múltiplas bactérias como; *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus spp.*, *Acinetobacter spp.* e *Staphylococcus aureus*.

Tradicionalmente a identificação dos microrganismos em amostras coletadas de PAVM, é baseada apenas em métodos de cultura que envolve isolamento, crescimento e identificação laboratorial através da morfologia microbiana e testes bioquímicos. Entretanto, a prevalência de alguns patógenos pode ser subestimada por esta técnica, pois a mesma, por conter várias etapas, pode fracassar no isolamento e crescimento de algumas bactérias, espécies de difícil cultivo, e principalmente, espécies não-cultiváveis. Vale ainda ressaltar que, devido as dificuldades na coleta das amostras, somadas às limitações na técnica de cultura, a prevalência de microrganismos anaeróbios estritos, também são subestimados nos pacientes com PAVM (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007).

Um dos métodos utilizados na exploração de diversidade microbiana é o checkerboard DNA-DNA hibridização que permite a investigação de múltiplas espécies de bactérias em grande número de amostras contendo microrganismos. É uma técnica rápida e relativamente viável do ponto de vista econômico (Socransky *et al.*, 2004).

A abordagem molecular bacteriana, de amostras coletadas da cavidade oral e do fluido pulmonar de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) sob VMI, utilizando o método checkerboard, poderá contribuir para identificação da patogenicidade da PVM, auxiliando no melhor conhecimento de sua fisiopatologia.

O presente estudo virá identificar a diversidade microbiana presente na cavidade oral e sua presença no Lavado Broncoalveolar (BAL) e aspirado endotraqueal, possibilitando analisar sua relação com resultados de hemocultura em pacientes internados em UTI sob VMI. Avaliará ainda o perfil microbiano nos diferentes períodos de IOT (12 h, 48 h e 96 h), a associação da PAVM com sinal vital Febre,

além de sua associação com a carga bacteriana das sondas de DNA das espécies estudadas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica

Pneumonia é uma infecção aguda dos pulmões, caracterizada por sinais e sintomas respiratórios, como tosse produtiva evidenciada pela presença de ronos na ausculta pulmonar, dispneia, taquipnéia e dores no peito, além de sintomas sistêmicos não-específicos, incluindo febre, fadiga, dores musculares e falta de apetite. O estabelecimento da pneumonia ocorre com a invasão bacteriana, especialmente bastonetes Gram-negativos (*Acinetobacter spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherihia coli*, *Klebsiella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.* e *Proteus mirabilis*) (Rello, 2005).

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos refere mecanismos relacionados à pneumonia nosocomial, como a aspiração de patógenos que colonizam a orofaringe, além da inalação de aerossóis que contêm bactérias, e ainda a transmissão hematogênica e translocação bacteriana do trato gastrointestinal, sendo a aspiração de microrganismos da orofaringe considerada o fator de maior prevalência nesse mecanismo (Brennan *et al.*, 2004; Paju, Scanapeico, 2007).

A pneumonia hospitalar tem grande incidência e está relacionada à morbimortalidade. A infecção cruzada, aspiração de microrganismos da orofaringe para o trato respiratório inferior e disseminação hematogênica são responsáveis pelo desenvolvimento de PAVM (Morais *et al.*, 2006). Na literatura, foram relatados casos demonstrando que a difusão hematogênica ocorre devido ao grande

número de bactérias provenientes de infecção periodontal (Paju, Scannapeico, 2007; Munro, Grap, 2004). O acesso de patógenos pela corrente sanguínea, seja a partir de cateteres, ou por outras vias, como translocação bacteriana a partir do trato gastrointestinal, também deve ser considerado. (Brennan *et al.*, 2004; Cutler; Davis 2005; Rosenthal *et al.*, 2006; Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007; Weber *et al.*, 2007).

Segundo as Diretrizes Brasileiras para tratamento das Pneumonias Adquiridas no Hospital e das Associadas à Ventilação Mecânica, (2005), PAVM é uma pneumonia adquirida que ocorre após 48 - 72 h do início da VMI por tubo oro traqueal (TOT), e são classificadas como precoce (ocorre até o quarto dia de VMI por TOT) e tardia (inicia após o quinto dia de VMI por TOT). O desenvolvimento dessas pneumonias prolonga o tempo da VM, o tempo de internação na UTI, aumenta as taxas de mortalidade e, conseqüentemente, os custos hospitalares, além disto, existem diferenças nas recomendações para a terapia antimicrobiana, de acordo com a variação dos patógenos e padrões de susceptibilidade de drogas.

Nas UTIs, a maioria dos diagnósticos de pneumonias hospitalares são associadas à VM, podendo ocorrer em 10 a 65% dos pacientes submetidos à VM. As taxas de mortalidade podem variar de 24% a 76% dos casos, inclusive diferindo pouco entre os autores e ainda, quando está associada a *Pseudomonas spp.* ou por *Acinetobacter spp.*, o risco de mortalidade destes pacientes varia de 2 à 10 vezes mais, quando comparados a pacientes sem VMI (Camargo *et al.*, 2004; Heo *et al.*, 2008).

Segundo Joseph (2010), PAVM precoce é frequentemente causada por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, enquanto PAVM tardia geralmente é causada por *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* ou *Enterobacter spp.* ou *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA), neste

caso, associado a mortalidade de 86%, além do custo duas vezes maior para o tratamento.

Estudo realizado no Hospital Universitário de Wisconsin, Madison, EUA, foram realizadas 399 broncoscopias (BAL), entre 1 de julho de 2002 à 31 de junho de 2007, para aquisição de amostras dos pulmões direito e esquerdo, num total de 798 amostras para cultura. Resultando em um total de 405 bactérias isoladas nas amostras de BAL, entre pulmão direito e esquerdo. As bactérias mais frequentes isoladas foram *Staphylococcus aureus* (27,6%), *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (6,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (16,8%) e *Haemophilus Influenzae* (15,5%) (Zaccard, Schell, Spiegel, 2009).

Em estudo retrospectivo avaliando todos os pacientes com suspeita de PAVM, que internaram na Unidade de Terapia Intensiva de Trauma no período de 1 de setembro de 1998 à 31 de agosto de 2001, no Presley Regional Trauma Center, em Memphis, Tennessee, EUA, apenas 39% de 299 pacientes com suspeita de PAVM, tiveram cultura positiva no BAL, denotando a importância do diagnóstico clínico (Wood, *et al.*, 2005).

Segundo Zaccard *et al.* (2009) a acurácia e diagnóstico precoce das espécies bacterianas associadas a PAVM, são importantes para determinar o tratamento antimicrobiano apropriado e subsequentes resultados positivos, enquanto que uma antibioticoterapia inapropriada pode resultar em elevação de custos, resistência de microrganismos e efeitos adversos, entretanto, a obtenção de amostras broncoscópicas, elevam os custos e requerem profissional especializado.

Evidências associam a colonização microbiana da orofaringe e do biofilme oral à PAVM. O TOT proporciona uma superfície inerte na qual as bactérias podem aderir, colonizar e crescer, formando biofilmes, de onde posteriormente poderão ser broncoaspiradas. Os indivíduos nestas condições, podem ainda possuir periodontopatias, que podem agravar ainda mais uma condição sistêmica pré-existente e

influenciar o curso das infecções respiratórias, em especial, as pneumonias (Rello, 2005; Cutler, Davis, 2005; Morais *et al.*, 2006).

Vandecandelaere *et al.* (2012) avaliaram o biofilme de TOT utilizando diferentes métodos microbiológicos como, clonagem e pirosequenciamento demonstrando diversidade de microrganismos com relevância para os grupos *S. aureus*, *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*. A combinação de diferentes métodos pode ser necessária para detectar a diversidade de microrganismos presentes no biofilme do TOT.

O diagnóstico clínico da PAVM é excessivamente difícil, porque existem outras possíveis causas de febre, leucocitose, secreção traqueal purulenta, portanto, requer complementação radiológica pulmonar e microbiológica. Em relação ao diagnóstico microbiológico, faz-se necessária cultura qualitativa e quantitativa de secreção de trato respiratório inferior, obtidas por métodos broncoscópicos ou não. (Joseph *et al.*, 2010).

As limitações e imprecisões do método de aspiração da secreção das vias aéreas para o diagnóstico de PAVM incentivaram o emprego de técnicas, que incluem, métodos broncoscópicos e não broncoscópicos. O aspirado traqueal apresenta boa correlação com resultados obtidos por escovado broncoscópico protegido (PSB), podendo ser empregado para orientar a antibióticoterapia. Atualmente o PBS e o lavado bronco-alveolar (BAL), são aceitos como métodos mais precisos para diagnosticar PAVM e são técnicas validadas por modelos animais e estudos clínicos. Embora os métodos broncoscópicos sejam mais seguros, o custo do exame, além da necessidade de broncoscopistas treinados limitam sua aplicação, enquanto técnicas não broncoscópicas com cateteres protegidos, mini lavado bronco-alveolar (mini-BAL) podem ser empregadas para coleta de secreção das vias aéreas inferiores, assim como as coletas por aspiração endotraqueal (Fagon *et al.*, 2007; Raghavendran *et al.*, 2007).

2.2 Higiene Oral

A Higiene Oral (HO) adequada é essencial para a manutenção da saúde bucal. Problemas bucais atuam como foco de disseminação de microrganismos patogênicos, com efeito, metastático sistêmico, especialmente em pessoas imunocomprometidas. Assim, a higiene oral evita o acúmulo do biofilme dental, matriz da colonização de grande quantidade de microrganismos, e propicia sensação de conforto evitando o ressecamento da mucosa oral e possíveis lesões (Morais *et al.*, 2006; Paju, Scannapieco, 2007).

O biofilme dental em pacientes de UTI aumenta com o tempo de internação, paralelamente a este aumento, também ocorre um aumento na probabilidade deste biofilme ser colonizado por patógenos respiratórios potenciais. Vários fatores como, temperatura, pH, fluxo salivar, nutrientes, aderência e aglutinação, afetam o crescimento de microrganismos na cavidade oral, que comumente estão em desequilíbrio em pacientes em estado crítico sob VM por TOT, o que reforça a necessidade de HO, pois o tártaro pode se formar dentro de 72 h. A condição precária de HO associada a alteração da pressão intra-*cuff* do TOT propicia o estabelecimento da pneumonia nosocomial decorrente da aspiração do conteúdo da orofaringe (Morais *et al.*, 2006).

A Revisão integrativa de Brennan *et al.* (2004), destacaram a prevalência de patógenos respiratórios colonizando a cavidade oral de pacientes internados em UTI, com atenção especial ao biofilme dentário, referindo o estudo de Scannapieco *et al.* (2008), no qual verificaram em 65% dos pacientes examinados, a presença de patógenos respiratórios entre eles: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e bacilos Gram-negativos.

Dentre os fatores que favorecem a colonização da orofaringe de pacientes críticos, está a placa dental que favorece o

crescimento de microrganismos que podem causar PAVM. A presença do TOT favorece o deslocamento de bactérias da orofaringe para o trato respiratório inferior por meio da glote aberta, além de interferir no mecanismo da escada-rolante ciliar, estimulando a secreção excessiva de muco (Kollef *et al.*, 2006; Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007).

A placa dental, atualmente denominada como biofilme oral ou biofilme dentário, foi definida como conjunto de bactérias que se formam sobre os dentes e superfícies sólidas presentes na cavidade oral. No Brasil, a Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia - SBPT, (2007), recomenda a descontaminação da cavidade bucal com clorexidina 0,12%, ou clorexidina associada à colistina, na prevenção de PAVM, em pacientes sob ventilação mecânica. O paciente deverá ter uma higiene bucal adequada mesmo na ausência de dentes e da alimentação via oral (Beraldo, Andrade, 2008).

Estudo epidemiológico multicêntrico realizado por Rosenthal *et al.*, (2006), com a participação de 55 UTIs de 46 hospitais, inclusive no Brasil, sugeriu que o uso de dispositivos invasivos para VM, e as condições bucais, podem ser fatores de risco para PAVM (Rosenthal, *et al.*, 2006).

Dentre as complicações decorrentes de alterações da cavidade oral estão as infecções periodontais e endodônticas, que são responsáveis por doenças sistêmicas como, por exemplo, a Endocardite Infecçiosa (EI), infecção que acomete o endocárdio. A doença periodontal é uma condição infecciosa bacteriana multifatorial, de natureza inflamatória, na qual o biofilme é o fator iniciador da doença e o acúmulo do biofilme destrói os tecidos de sustentação do órgão dental (Kahn *et al.*, 2010).

A partir do conhecimento de que a colonização orofaríngea está associada ao desencadeamento de diversas doenças sistêmicas em adultos, incluindo enfermidades cardiovasculares e pulmonares, é possível supor que, se uma maior atenção for dada a

manutenção da HO, na rotina da assistência de enfermagem, resultados satisfatórios poderão ser obtidos (Brennan *et al.*, 2004; Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007).

Em pacientes sob VMI, a HO já é normalmente precária devido aos dispositivos como o TOT e os fixadores, além do fato de que esses indivíduos estão expostos a diversos fatores adicionais, como a diminuição da limpeza natural da boca promovida pela mastigação de alimentos duros e fibrosos e a movimentação da língua e das bochechas durante a fala. Há também a redução do fluxo salivar pelo uso de alguns medicamentos, que contribuem para o aumento do biofilme e, conseqüentemente, de sua complexidade, favorecendo a colonização oral por patógenos respiratórios (Morais *et al.*, 2006).

Os pacientes internados em UTI requerem um cuidado oral completo, para isto a avaliação de um cirurgião dentista permite identificar fatores de risco e realização de procedimentos específicos, além da participação na criação de protocolos que direcionem a HO de forma adequada e padronizada por todos os profissionais. Entretanto, atualmente, nas UTIs é papel do enfermeiro, avaliar a cavidade oral do paciente, implementar a sua assistência de acordo com as necessidades individuais, realizar treinamento da equipe conforme percepção destas necessidades, promover a saúde e prevenir infecções em qualquer circunstância, orientar sobre os cuidados ao paciente e motivar os profissionais inseridos neste contexto sobre a importância da higiene e saúde bucal de paciente internados em UTIs (Abidia, 2007).

Em adultos saudáveis, o microrganismo predominante na cavidade oral é *Streptococcus viridans*, mas a microbiota oral nos pacientes críticos muda e passa a ser predominantemente de gram-negativos, que pode ser composta por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Haemophilus influenzae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Munro, Grap, 2004; Amaral *et al.*, 2009). Em estudo clínico Heo *et al.* (2008), identificou que a microbiota

oral pode ser composta por *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter spp* e *Enterococcus spp*.

Mesmo que as bactérias usualmente responsáveis pelo estabelecimento da PAVM, como *P. aeruginosa*, *S. aureus* (MRAS), *Acinetobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus hemolyticus* e *S. pneumoniae*, não sejam comuns da microbiota orofaríngea, esses microrganismos podem colonizar a cavidade oral em algumas situações como no caso de pacientes internados em UTIs. Nesses casos, o percentual total dessas bactérias na boca pode chegar a 70% no biofilme dentário, 63% na língua e 73% no TOT. Um achado preocupante adicional é a presença de um número maior de cepas resistentes, como, por exemplo, *S. aureus* resistente à meticilina, após 72 h de intubação (Chan EY *et al.*, 2007).

A redução do número de microrganismos da cavidade oral é a melhor forma de reduzir o risco de PAVM. Intervenções de cuidado oral, para pacientes críticos em VM, previnem o acúmulo de biofilme e estimulam a imunidade oral local durante o período de hospitalização, podendo reduzir o desenvolvimento de PAVM (Kollef, 2004; Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007).

Uma diminuição de até 40% de casos de pneumonia foi encontrada ao melhorar a HO dos pacientes através de recursos mecânicos (*Swabs*, escovas dentais pediátricas, espátulas com gaze, etc) e químicos (soluções antissépticas e enxaguantes bucais. (Paju, Scanapeico, 2007).

Verificou-se pela revisão de literatura, que a ocorrência de PAVM está diretamente relacionada a precária HO, uma vez que todo aparato utilizado durante a IOT, pode favorecer o acúmulo de biofilme, potencializando os riscos de infecção. Sendo assim o estudo da microbiota presente no BAL, aspirado endotraqueal bem como da

cavidade bucal é de fundamental importância a fim de direcionar protocolos terapêuticos eficazes no combate a estas infecções.

3 PROPOSIÇÃO

- a) Estudar a diversidade microbiana presente na cavidade oral e no BAL (mini-BAL) de pacientes internados em UTI sob VMI, através da técnica *Checkerboard DNA-DNA Hybridization*;
- b) Avaliar se o perfil microbiano presente na cavidade oral está presente no Lavado Bronco Alveolar (mini-BAL), em diferentes períodos de tempo da VMI (12 h, 48 h, 96 h) e na extubação;
- c) Identificar a associação de entre PAVM com o DNA das espécies bacterianas estudadas;
- d) Detectar a presença de espécies bacterianas circulantes na corrente sanguínea de pacientes internados em UTI sob VMI por meio dos resultados de hemocultura;
- e) Identificar a associação de hemocultura positiva com febre, pneumonia e com o DNA das espécies bacterianas estudadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CONEP), protocolo nº 283.047 (ANEXO A). O projeto se desenvolveu com a coleta das amostras em pacientes internados na UTI de um Hospital de médio Porte com atendimento de alta complexidade (Hospital POLICLIN), na cidade de São José dos Campos de agosto de 2013 a fevereiro de 2014, conforme autorização (ANEXO B). A análise microbiológica foi realizada no Laboratório de Microbiologia Endodôntica do Departamento de Odontologia Restauradora da UNESP, SJC, em parceria com a Universidade de Guarulhos (UNG).

4.1 Fase Clínica

4.1.1 Procedimentos Clínicos e Seleção dos Pacientes

Foram incluídos 10 pacientes críticos internados em UTI sob VMI por TOT. Todos os pacientes foram avaliados previamente a primeira coleta, para a realização da anamnese, na qual foram registrados os dados pessoais e as condições de saúde geral de todos os indivíduos incluídos no estudo e anormalidades da cavidade oral (APÊNDICE A). Foi registrada a terapêutica medicamentosa (Antibióticoterapia – tipo, dose, tempo), e dados clínicos quanto a saúde bucal tais como: condição de higiene oral, número de dentes presentes na cavidade oral e presença de alterações na mucosa e gengiva.

Foram utilizados como critérios inclusão pacientes submetidos a IOT, com idade de 18 anos a 85 anos, presença de pelo menos um dente, sem doença pulmonar grave e terminal como por exemplo tumor pulmonar ou infecção pulmonar conhecida e previamente comprovada por exames microbiológicos ou de imagem.

Como critérios de exclusão: pacientes terminais e graves com necessidade de sistema de suporte circulatório, Balão Intra- Aórtico, necessidade de monitorização hemodinâmica invasiva, Swan Ganz, desdentados totais, infecção oral aguda, aspecto do BAL purulento e não ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, pelo responsável, devidos às condições que impossibilitam o próprio paciente (APÊNDICE B).

As coletas foram consecutivas de acordo com os critérios de inclusão e a partir do primeiro paciente.

4.1.2 Coleta das Amostras

Os pacientes que participaram do protocolo de coletas tiveram sua evolução clínica sem interferência da pesquisa e, portanto alguns evoluíram com extubação precoce, outros foram a óbito antes do término das coletas, o que denota a clareza dos dados e rigor ético dos pesquisadores, bem como, a evolução natural de cada patologia, independente da participação no estudo. Não houve interferência no protocolo de Higiene Oral (HO) institucional; foram realizadas as coletas nas condições em que comumente os pacientes são mantidos.

As coletas da cavidade oral (espaço sub gengival e dorso da língua) e do fluido pulmonar (BAL) e sangue venoso, foram realizadas nos seguintes locais, de acordo com o tempo a partir da IOT:

- primeiras 12 h de IOT: (lavado broncoalveolar, espaço, subgengival com cone de papel, dorso da língua com *Swab* e sangue

venoso),

- após 48 h de IOT: (secreção do aspirado traqueal, espaço subgengival com cone de papel, dorso da língua com *Swab* e sangue venoso),

- após 96 h de IOT: (secreção do aspirado traqueal, espaço subgengival com cone de papel, dorso da língua com *Swab* e sangue venoso),

- no momento da extubação: coleta da região interna do TOT com *Swab*.

A coleta de hemocultura seguiu o protocolo Institucional e a análise foi realizada no Laboratório de Análises Bioclin, de acordo com indicação; os resultados obtidos foram comparados com os demais resultados das análises das amostras coletadas pelo método Checkerboard.

Todas as amostras, após a coleta, foram transportadas em meio de transporte VMGAIII em temperatura até 2 °C, respeitando as normas da Agencia Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e mantidas a temperatura de -20 °C, para a manutenção da viabilidade e posterior processamento laboratorial.

4.1.3 Coleta das Amostras da Cavidade Oral

As amostras da cavidade oral foram coletadas da região mediana lateral da língua de ambos os lados, as quais foram realizadas por meio de um *Swab* esterilizado (Absorve, Labcenter, SP) (Figura 1). A seguir, o *Swab* foi imediatamente colocado em microtubo plástico de 1,5 mL do tipo “eppendorf” contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGAIII e transportadas ao o Laboratório de Microbiologia do Departamento de

Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP.

Da mesma forma, para a coleta de amostras do espaço subgengival, 5 cones de papel absorventes (Dentsply Maillefer Ind. e Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil) estéreis, foram introduzidos um de cada vez no espaço subgengival de dentes anteriores presentes (preferencialmente incisivos, devido a presença do TOT), permanecendo nesta posição por 60 segundos. Os cones de papel foram removidos do sulco gengival e armazenados em tubos tipo eppendorf (1,5 mL) estéril contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGAIII e transportados ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP (Figura 2).



Figura 1 – Coleta do Dorso da Língua com *Swab*.



Figura 2 – Coleta do Sulco Gengival com Cone de Papel.

4.1.4 Coleta do Lavado Broncoalveolar (mini-BAL)

A primeira amostra do BAL (primeiras 12 h de IOT) foi coletada através de cateter protegido para coleta de lavado broncoalveolar (Mini BAL), Kimberly-Clarck ®, (Figura 3) a qual foi obtida com técnica de aspiração brônquio alveolar em frasco estéril. Em seguida, foi imediatamente introduzido em microtubo plástico de 1,5 mL do tipo *ependor*® contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGAIII e transportado em temperatura de até 2 °C para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP e mantido a temperatura -20 °C.



Figura 3 - A) Coleta do Lavado Broncoalveolar; B) Aspiração mini-BAL.

As demais amostras de secreção do aspirado traqueal após 48 h de IOT e após 96 h de IOT foram realizadas por técnica de aspiração endotraqueal, em frasco estéril, utilizando sonda de aspiração traqueal nº 12 (Figura 4). O conteúdo aspirado foi imediatamente introduzido em microtubo

plástico de 1,5 mL do tipo “eppendorf” contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGAIII e transportado em temperatura de até 2 °C para o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP e mantida a temperatura -20 °C.



Figura 4 - Aspiração Endotraqueal.

4.1.5 Amostra Sanguínea para Hemocultura

As amostras para hemocultura foram obtidas diante da indicação e prescrição médica. Nem sempre foi realizada antes da introdução do antibióticoterapia (pois os pacientes críticos geralmente utilizam antibióticoterapia profilática, devido aos procedimentos invasivos, e até mesmo antes de resultados de exames laboratoriais, utilizado de forma empírica ou após exame clínico e sinais e sintomas de quadro infeccioso), ou antes da próxima dose de antibiótico, conforme o protocolo Institucional. Foram realizadas coletas de duas amostras (20 ml), obtidas em 2 locais

diferentes (por exemplo membro superior direito e membro superior esquerdo), conforme técnica rigorosa de antissepsia de acordo com a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH), e foram imediatamente encaminhadas para análise no laboratório de microbiologia BIOCLIN, utilizando o método Trifásico em Estufa Hemobac Trifásico® - Probac do Brasil (Figura 5).

O sistema é composto por um laminocultivo com 2 faces acoplado a parte superior de um recipiente plástico contendo um caldo suplementado com extrato de levedura e polianetol-sulfonato de sódio (SPS) que na apresentação NA (neutralizados de antimicrobianos) é acrescido de substâncias orgânicas e inorgânicas para neutralização de antimicrobianos. As faces do laminocultivo são: Face larga – Ágar Chocolate e próximo a tampa o Indicador de CO₂ (de forma redonda) que detecta o crescimento de bactérias e fungos; Face dividida: Ágar Sabouraud, Ágar MacConkey. O procedimento é automatizado (uso da estufa com temperatura controlada, agitação intermitente e inversão programada) com incubação de cinco a sete dias, a uma temperatura de 35 °C a 37 °C e com observação dos frascos por um técnico, a cada 4 a 6 horas. Na leitura, a ausência de alteração na cor é reportada como negativa, a alteração da cor para rosa forte ou vermelho denota a multiplicação de microrganismos identificando sua presença na amostra e a partir desse resultado positivo é identificado o n^o de colônias e a coloração Gram é realizada. Inclusive a partir de resultados positivos, foram realizados os antibiogramas, para verificação de sensibilidade dos microrganismos identificados.



Figura 5 - A) Amostras de sangue dentro da estufa Hemobac Trifásico®; B) Imagem da amostra de sangue dentro do tubo a ser colocado na estufa.

4.2 Fase Laboratorial

4.2.1 Processamento das Coletas Microbiológicas

As amostras obtidas foram avaliadas pelo método *Checkerboard DNA-DNA hybridization*, utilizado para estudar a diversidade microbológica bucal, do lavado broncoalveolar e sangue venoso de pacientes sob VMI, investigando 40 espécies bacterianas.

Os tubos eppendorf contendo os 3 cones de papel, *Swab*, lavado broncoalveolar e soro (respectivamente - amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foram agitados até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos microrganismos e 300 μ L de cada amostra foram transferidos para outro tubo eppendorf. Após esse procedimento, os tubos foram centrifugados a 8.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante neles contido foi então descartado e o pellet ressuspendido com 150 μ L de solução TE (10 Mm Tris-HCL, 1 Mm EDTA pH 7,6). A cada tubo plástico contendo amostras e solução tampão TE, foram acrescentados 100 μ L de NaOH (Labsynth) a 0,5 Mm para que o DNA bacteriano permanecesse viável por um longo período de tempo. Em seguida, as amostras foram armazenadas sob refrigeração a -20 °C até que fossem analisadas (Figura 6).



Figura 6 - Preparo das Amostras: *pellet* de microrganismos para resuspensão em solução TE.

4.2.2 Análise Microbiológica por Checkerboard DNA-DNA Hybridization

O método foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Odontologia II – Microbiologia, Imunologia e Biologia Molecular da Universidade de Guarulhos (UnG).

As amostras obtidas foram avaliadas pelo método “*Checkerboard DNA-DNA hybridization*” utilizado para estudar a diversidade microbiológica da mucosa oral, espaço subgengival, soro venoso e fluido pulmonar, investigando 40 espécies bacterianas.

Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação nas infecções orais e saliva.

4.2.3 Colocação das Amostras na Membrana de Nylon

Uma membrana de nylon (15 x 15 cm) com carga positiva (Amersham Biosciences, Chicago, IL- USA) foi montada em Minislot 30® (Immuntics, Cambridge, MA – USA). Cada suspensão de cada amostra contendo DNA livre foi depositada nas fendas do Minislot 30® e o DNA permaneceu depositado na membrana de *nylon* (Figuras 7 e 8). A membrana foi removida do aparato e o DNA, previamente depositado na mesma, foi fixado por intermédio de aquecimento em forno a 120 °C, por 20 min. As duas últimas canaletas do *Minislot* 30® foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies dos microrganismos que foram investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas.



Figura 7- A) Membrana de Nylon; B) Montagem Minislot 30®.



Figura 8 - A) Fechamento Aparato Minislot 30®; B) Depósito das Amostras nas Canaletas.

4.2.4 Hibridização da Membrana com as Sondas de DNA

Após a fixação do DNA na membrana, esta foi pré-hibridizada a 42 °C, por uma hora, numa solução de formamida 50%, caseína 1%, 5 X SSC (Solução Salina Citrada) 25 nM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura (Figura 9A).



Figura 9 - A) Fixação do DNA na Membrana; B) Membrana no Miniblotted 45®.

A membrana foi então colocada sob a placa acrílica do *Miniblotter 45*®, (Immunetics, Cambridge, MA – USA) (Figura 9B), rotacionada 90 ° de sua posição original, com as linhas contendo o DNA fixado, perpendiculares às canaletas do *Miniblotter 45*®. O *Miniblotter 45*® contém 45 canaletas que servem, cada uma, para a colocação de uma sonda de DNA (Figura 10).

As sondas de DNA específicas para as 40 espécies usadas neste estudo (Quadro 1) foram confeccionadas usando *random primer digoxigeninlabeling kit* (Boehringer Mannheim, Indianápolis, IN – USA), como descrito por Feinberg e Volgelstein (1983). Essas espécies foram selecionadas devido à sua associação as infecções orais e saliva.



Figura 10 - A) Fechamento do *Miniblotter 45*®; B) Aplicação das Sondas nas Canaletas.

Quadro 1 - Relação das cepas empregadas para o desenvolvimento das sondas de DNA bacteriano

Espécie	Cepa (ATCC)	Espécie	Cepa (ATCC)
<i>Actinomyces gerezseriae</i>	238060	<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<i>Parvimonas micra</i>	33270
<i>Actinomyces oris</i>	43146	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	43718 + 29523	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Propionibacterium acnes</i>	11827+ 11828
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	33612	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<i>Streptococcus mitis</i>	49456
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Eubacterium saburreum</i>	33271	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Fusobacterium nucleatum spp. Polymorphum</i>	10953	<i>Tanerella forsythia</i>	43037
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Nucleatum</i>	25586	<i>Treponema denticola</i>	B1
<i>Fusobacterium nucleatum ssp. Vicentii</i>	49256	<i>Treponema socranskii</i>	S1
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Veillonella parvula</i>	10790
<i>Gemella morbillorum</i>	27824		
<i>Leptotrichia bucallis</i>	14201		

Anteriormente ao seu uso, as sondas foram testadas com uma mistura controle contendo as espécies investigadas, numa concentração de 10^4 células bacterianas. Suas concentrações foram ajustadas de tal modo que a intensidade dos sinais de todas as sondas fosse semelhante.

As sondas de DNA foram contidas numa solução de hibridização (formamida 45%, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA levedura, sulfato de dextrano 10%, caseína 1% e 20 mg/mL de sonda de DNA). Cada canaleta do *Miniblotter* 45® foi preenchida com 135 μ L de uma determinada sonda (Figura 10B). As sondas hibridizaram perpendicularmente às linhas contendo o DNA bacteriano fixado, propiciando um formato xadrez com as linhas de DNA horizontais, e as sondas verticais. O aparato *Miniblotter* 45® e a membrana com as sondas e o DNA das amostras bacterianas fixado, foram colocados dentro de um saco plástico umedecido para evitar a desidratação das mesmas e incubados a 42 °C para ocorrer a hibridização (Figura 11). A hibridização das membranas com as sondas ocorreu durante um período mínimo de 12 h (*overnight*).



Figura 11 - Pré Hibridização da Membrana.

4.2.5 Detecção das Espécies

Após a hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do *Miniblotter* 45® e lavadas por 40 min a 65 °C, numa solução adstringente de PO₄ *Buffer* (Tampão de fosfato), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora, sob agitação, numa solução bloqueadora contendo ácido maleico 0,1 M, NaCl 3 M, NaOH 0,2 M, Tween 20 0,3%, caseína 0,5%, pH 8,0 e por 30 min na mesma solução contendo anticorpo anti-digoxigenina (*Anti-Digoxigenin-AP Fabfragments* – Roche Diagnostics GmbH, Mannheim–Germany) conjugado à fosfatase alcalina (Boehringer, Mannheim–Germany), numa diluição 1/25.000⁸. As membranas foram, então, lavadas com uma solução de ácido maleico 0,1 M, NaCl 3 M, NaOH 0,2 M, Tween 20 0,3%, pH 8,0, duas vezes por 20 min, e uma vez por 5 min em Tris HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM, pH 9,5. Em seguida as membranas foram incubadas em solução detectora, *CDP-Star Detection Reagent* ® (Amershan Biosciences UK Limited, Buckinghamshire – UK), por 60 min a 37 °C. Finalmente, as membranas foram colocadas em cassete sob um filme radiográfico (Kodak® X-OMAT Kodak Brasileira Com. E Ind. Ltda, São José dos Campos, SP) por aproximadamente 40 min, e os filmes foram revelados logo em seguida (Figura 12).



Figura 12 – A) Lavagem da membrana após hibridização; B) Lavagem da membrana em Banho Maria com agitação; C) Agitação da membrana para lavagem; D) Membranas colocadas em cassete.

O sinal produzido por uma determinada sonda das amostras foi comparado ao sinal produzido pela mesma sonda nos dois controles contendo 10^5 e 10^6 células. A intensidade de hibridização foi dividida em 6 classes diferentes em relação aos níveis observados de contagem: (0) não detectado; (1) $< 10^5$ células, (2) cerca de 10^5 células, (3) entre 10^5 e 10^6 células; (4) cerca de 10^6 células; (5) superior a 10^6 células.

A sensibilidade deste ensaio foi ajustado para permitir a detecção de 10^4 células de uma dada espécie, ajustando a concentração de cada sonda de DNA.

4.3 Análise Estatística

Os dados coletados foram transferidos para uma planilha e depois analisados utilizando o software STATA 12.0 (StataCorp. College Station, Texas, EUA). Os dados da carga bacteriana, obtidos a partir do *checkerboard* foram apresentados em diferentes pontuações que variam de 0-5. Como os dados não tiveram uma distribuição normal, testes estatísticos não-paramétricos foram utilizados. A fim de comparar a carga bacteriana entre diferentes locais de coleta, independentemente do tempo de coleta, o teste de Mann-Whitney Dunn foi utilizado. Além disso, foi utilizado o teste de Wilcoxon de pares combinados para comparar a carga bacteriana no mesmo local de coleta, em diferentes tempos. A fim de determinar possíveis espécies bacterianas associadas à presença de hemocultura positiva, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis. Além disso, o teste exato de Fisher foi utilizado para testar a associação entre sinais clínicos e hemocultura positiva e pneumonia. Para todos os testes acima referidos, o nível de significância foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Perfil da amostra

Dos 10 pacientes do estudo, seis eram do sexo masculino e quatro do sexo feminino, cinco com diagnósticos cirúrgicos e cinco com diagnósticos clínicos, a faixa etária variou de 35 à 85 anos, oito pacientes evoluíram para óbito, durante a pesquisa. Os demais dados da evolução clínica estão esquematizados no Quadro 2.

5.2 Identificação da carga bacteriana das sondas de DNA

A Identificação da carga bacteriana das sondas de DNA, por sítio de coleta e nos diferentes tempos a partir da IOT, estão demonstrados (APÊNDICE C) e na Tabela 1.

Quadro 2 - Perfil da amostra

Pac.	Idade	M	F	Diag. Clin.	Diag. Cir.	Higiene oral	Tártaro visível	Nº de dentes	Hemocultura	Antibióticos	Febre	PAVM
1	71	X			X	Insatisfatória.	X	5	-	(Cefuroxima)	-	
2	48	X			X	Insatisfatória.	X	20	<i>S. epidermidis/S. aureus</i>	(Meropenem)	X	
3	78		X		X	Insatisfatória.	X	6	<i>S. aureus</i>	Ceftriaxona, (Metronidazol), (Piperacilina+Tazobactam), (Meropenem).	X	Ausculta RX.
4	35	X			X	Insatisfatória.	-	32	-	(Cefalozina) +Tazobactam), (Piperacilina	-	
5	70		X	X		Insatisfatória.	X	4	<i>S. aureus</i>	(Piperacilina + Tazobactam)	X	Ausculta RX.
6	56		X		X	Insatisfatória.	X	8	<i>S. epidermidis/S. aureus</i>	(Meropenem) (Vancocina), (Linezolida)	X	
7	59	X		X		Insatisfatória.	X	16	(-)	(Trimetoprima +Sulfametoxazol), (Piperacilina+Tazobactam), (Levofloxacino), (Teicoplanina)	X	Ausculta RX.
8	57	X		X		Insatisfatória.	X	3	(-)	Cefazolina, (Trimetoprima +Sulfametoxazol)	X	Ausculta RX.
9	70		X	X		Insatisfatória.	X	12	<i>S. aureus</i>	(Piperacilina + Tazobactam)	X	Ausculta RX.
10	85	X		X		Insatisfatória.	X	2	(-)	-	-	

(Pac): Paciente; (M): Sexo Masculino; (F): Sexo Feminino; (Diag.Clin.): Diagnóstico Clínico; (Diag.Cir.): Diagnóstico Cirúrgico;

Tabela 1 – Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA, Inter grupos e Intra grupos. (continua)

	MUCOSA			SUBGENGIVAL			BAL/TRAQUEAL		
	12 h	48 h	96 h	12 h	48 h	96 h	12 h	48 h	96 h
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	0 (0) ^{Aa}	0.12 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}	0.12 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}	0.12 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
<i>A. gereceseriae</i>	0.43 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{Aa}	0.80 (0) ^{ABa}	1.25 (0.5) ^{Aa}	0.86 (1) ^{Aa}
<i>A. israelii</i>	0.64 (0) ^{Aa}	0.88 (0) ^{Aa}	0.85 (1) ^{ABa}	1.47 (0.5) ^{Aa}	1.12 (1) ^{ABa}	0.42 (0) ^{BCa}	1.47 (0.5) ^{Aa}	1.12 (1) ^{ABa}	0.42 (0) ^{BCa}
<i>A. oris</i>	0.30 (0) ^{Aa}	1.0 (1) ^{Ab}	0.28 (0) ^{Aa}	1.0 (1) ^{ABa}	0.63 (1) ^{ABa}	0.43 (0) ^{AaCa}	0.50 (0.5) ^{Ba}	1.63 (2) ^{Ba}	1.57 (1) ^{BCa}
<i>A. odontolyticus</i>	0.30 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{ACb}	0.14 (0) ^{Aa}	0.70 (1) ^{Ba}	0 (0) ^{ABb}	0.43 (0) ^{Ab}	0.40 (0) ^{ABa}	1.0 (0.5) ^{Cb}	1.42 (1) ^{Bb}
<i>Tanarella forsythia</i>	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Aa}	0.30 (0) ^{Aa}	0.12 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{ABa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.75 (0.5) ^{Ba}	0.57 (0) ^{Ba}
<i>Campylobacter gracilis</i>	0.20 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}	1.0 (0.5) ^{Ba}	0.50 (0) ^{Aa}	0.72 (0) ^{ABa}	0.30 (0) ^{ABa}	1.13 (0.5) ^{Aa}	1.42 (1) ^{Ba}
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	0.10 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.43 (0) ^{ABa}	0.60 (0.5) ^{Ba}	0.13 (0) ^{Ab}	0 (0) ^{Ab}	0.70 (0) ^{Ba}	1.25 (0) ^{Ba}	1.57 (2) ^{Ba}
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	0.10 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}	0.60 (0.5) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}	0.60 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{ABa}	0.85 (0) ^{ABa}
<i>Campylobacter rectus</i>	0.20 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Aa}	0.50 (0.5) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.30 (0) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Ba}	0.43 (0) ^{Ba}
<i>Campylobacter snowae</i>	0.30 (0) ^{ABa}	0.13 (0) ^{ABa}	0.28 (0) ^{ACa}	0.30 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{BCa}	0.85 (1) ^{Bb}
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	0 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	1.10 (0.5) ^{Ba}	0.25 (0) ^{Aa}	0.86 (0) ^{Ba}	0.50 (0) ^{Ba}	1.75 (1.5) ^{Bb}	0.86 (1) ^{Ba}
<i>Eikenella corrodens</i>	0.40 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.20 (0.5) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.71 (1) ^{Ba}	0.30 (0) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Aa}	0.86 (1) ^{Ba}
<i>Enterococcus faecalis</i>	0 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}	0.20 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.28 (1) ^{Aa}	0.20 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.28 (1) ^{Aa}
<i>Eubacterium nodatum</i>	0.60 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	1.42 (1) ^{Ab}	1.30 (0) ^{Ba}	0.88 (0) ^{ABa}	1.14 (0) ^{Aa}	1.30 (1) ^{Ba}	2.75 (3) ^{Cb}	2.42 (3) ^{Ab}
<i>Eubacterium saburreum</i>	0.20 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{ABa}	0.43 (0) ^{Aa}	0.80 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Bb}	0.86 (0) ^{Aa}	0.80 (1) ^{ABa}	1.13 (3) ^{ACa}	1.29 (1) ^{Aa}
<i>Fusobacterium nuc. Polymorphum</i>	0.60 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Aa}	1.0 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Ab}	0.29 (0) ^{Ab}	1.40 (1) ^{Aa}	1.63 (1.5) ^{Ba}	1.71 (3) ^{Ba}
<i>Fusobacterium nucl. Vicentii</i>	0.10 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.29 (0) ^{Aa}	1.0 (0) ^{Ba}	0 (0) ^{Ab}	0.71 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.63 (0) ^{ABa}	0.43 (0) ^{Aa}
<i>Fusobacterium nucl. Nucleatum</i>	1.40 (1) ^{Aa}	0.88 (0) ^{ABa}	1.14 (0) ^{Aa}	1.70 (2) ^{Ba}	0.50 (0) ^{Ab}	0.57 (0) ^{Aa}	1.60 (2) ^{ABa}	2.50 (3.5) ^{ABb}	2.28 (3) ^{Ab}
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}	0.40 (0) ^{ABa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}	0.40 (0) ^{ABa}	0.75 (1) ^{Ab}	0.86 (1) ^{Bb}
<i>Gemella morbillorum</i>	0.60 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}	0.40 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	1.0 (1) ^{Bb}	0.60 (0.5) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.86 (1) ^{Ba}
<i>Leptotrichia buccalis</i>	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Ab}	1.10 (1) ^{Ba}	0 (0) ^{Ab}	0.14 (0) ^{Ab}	0.60 (0) ^{Ba}	0.75 (0) ^{Ba}	1.43 (1) ^{Bb}

Tabela 1 – Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA, Inter grupos e Intra grupos (concluído)

	MUCOSA				SUBGENGIVA				BAL/TTRAQUEAL			
	12 h	48 h	96 h	12 h	48 h	96 h	12 h	48 h	96 h	12 h	48 h	96 h
<i>Neisseria mucosa</i>	0.60 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.58 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.58 (0) ^{Aa}	0.60 (0.5) ^{Aa}	1.25 (1) ^{Bb}	1.71 (2) ^{Bb}			
<i>Prevotella intermedia</i>	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.30 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.20 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Ba}	0 (0) ^{Aa}			
<i>Prevotella melaninogenica</i>	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Aa}	0.40 (0) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.30 (0) ^{Aa}	0.88 (0.5) ^{Ba}	1.0 (1) ^{Ba}			
<i>Parvimonas micra</i>	0.40 (0) ^{Aa}	1.25 (1) ^{Ab}	0.43 (0) ^{Aa}	0.90 (0.5) ^{ABa}	0.38 (0) ^{Ba}	0.43 (0) ^{Aa}	1.70 (2) ^{Ba}	1.63 (1.5) ^{Aa}	2.0 (3) ^{Ba}			
<i>Prevotella nigrescens</i>	0.10 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Ab}	0.29 (0) ^{Aa}	0.60 (0) ^{Ba}	0.38 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Aa}	0.30 (0) ^{ABa}	1.13 (0.5) ^{Bb}	0.86 (0) ^{Ab}			
<i>Streptococcus anginosus</i>	0.30 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Ab}	0.70 (0.5) ^{Ba}	0.38 (0) ^{Aa}	0.57 (0) ^{Aa}	0.60 (0) ^{ABa}	0.75 (0) ^{Ba}	0.43 (0) ^{Aa}			
<i>Streptococcus gordonii</i>	0.10 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Ab}	0.10 (0.5) ^{Aa}	0 (0) ^{Ba}	0.14 (0) ^{Aa}	0.10 (0) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Ab}	0.57 (0) ^{Ab}			
<i>Streptococcus intermedius</i>	0.30 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.29 (0) ^{Aa}	0.50 (0.5) ^{ABa}	0.13 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.14 (0) ^{Aa}			
<i>Streptococcus mitis</i>	0.80 (0.5) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}	0.60 (0.5) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{Aa}	0.30 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Aa}			
<i>Selenomonas noxia</i>	0 (0) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Ab}	0.10 (0) ^{ABa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}	0.30 (0) ^{Ba}	0.50 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{Aa}			
<i>Streptococcus oralis</i>	0.70 (0.5) ^{ABa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}	0.70 (1) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{ABa}	0.30 (0) ^{Ba}	1.0 (1) ^{Ba}	0.14 (0) ^{Aa}			
<i>Streptococcus sanguinis</i>	0.40 (0) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Aa}	0.57 (0) ^{Aa}	0.60 (0.5) ^{Aa}	0.75 (0.5) ^{Aa}	0.86 (0) ^{Ba}	0.80 (0) ^{Aa}	1.13 (1) ^{Aa}	1.14 (1) ^{Ba}			
<i>Streptococcus constellatus</i>	0 (0) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.30 (0) ^{Ba}	0 (0) ^{Ab}	0.14 (0) ^{Ab}	0 (0) ^{Aa}	0.38 (1) ^{Bb}	0.28 (0) ^{Bb}			
<i>Treponema denticola</i>	0.60 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}	1.0 (0) ^{ABa}	1.0 (0.5) ^{Aa}	1.14 (0) ^{Ba}	0.90 (0) ^{ABa}	2.12 (3) ^{Bb}	2.14 (3) ^{Bb}			
<i>Treponema socransckii</i>	1.1 (0.5) ^{Aa}	1.0 (0) ^{Aa}	2.14 (2) ^{Ab}	2.1 (3) ^{Ba}	0.88 (0) ^{Ab}	1.71 (2) ^{Bb}	2.2 (2.5) ^{Ba}	2.25 (3) ^{Bb}	2.85 (3) ^{Ab}			
<i>Veillonella parvula</i>	0.5 (0.5) ^{Aa}	0.88 (1) ^{ABa}	0.71 (1) ^{Ab}	1.1 (1) ^{Ba}	0.75 (1) ^{ABb}	0.57 (1) ^{Ab}	1.2 (1) ^{Ba}	1.63 (1.5) ^{Ab}	2.14 (3) ^{Bb}			

(Negrito): diferença estatística inter e intra grupos; (Letras maiúsculas): indicam diferença entre as colunas; (Letras minúsculas): indicam diferença entre as linhas.

A frequência de detecção e concentração de DNA das espécies bacterianas estudadas nos diferentes locais: mucosa oral, espaço subgengival, BAL/aspirado endotraqueal, e cânula endotraqueal após 12 h, 48 h e 96 h de IOT, está ilustrada nas (Figuras 13,14 e 15).

As (Figuras 16, 17 e 18), ilustram a frequência de detecção e concentração de DNA das espécies bacterianas estudadas por local de coleta: mucosa oral, espaço subgengival, BAL/aspirado endotraqueal nos diferentes tempos de coleta.

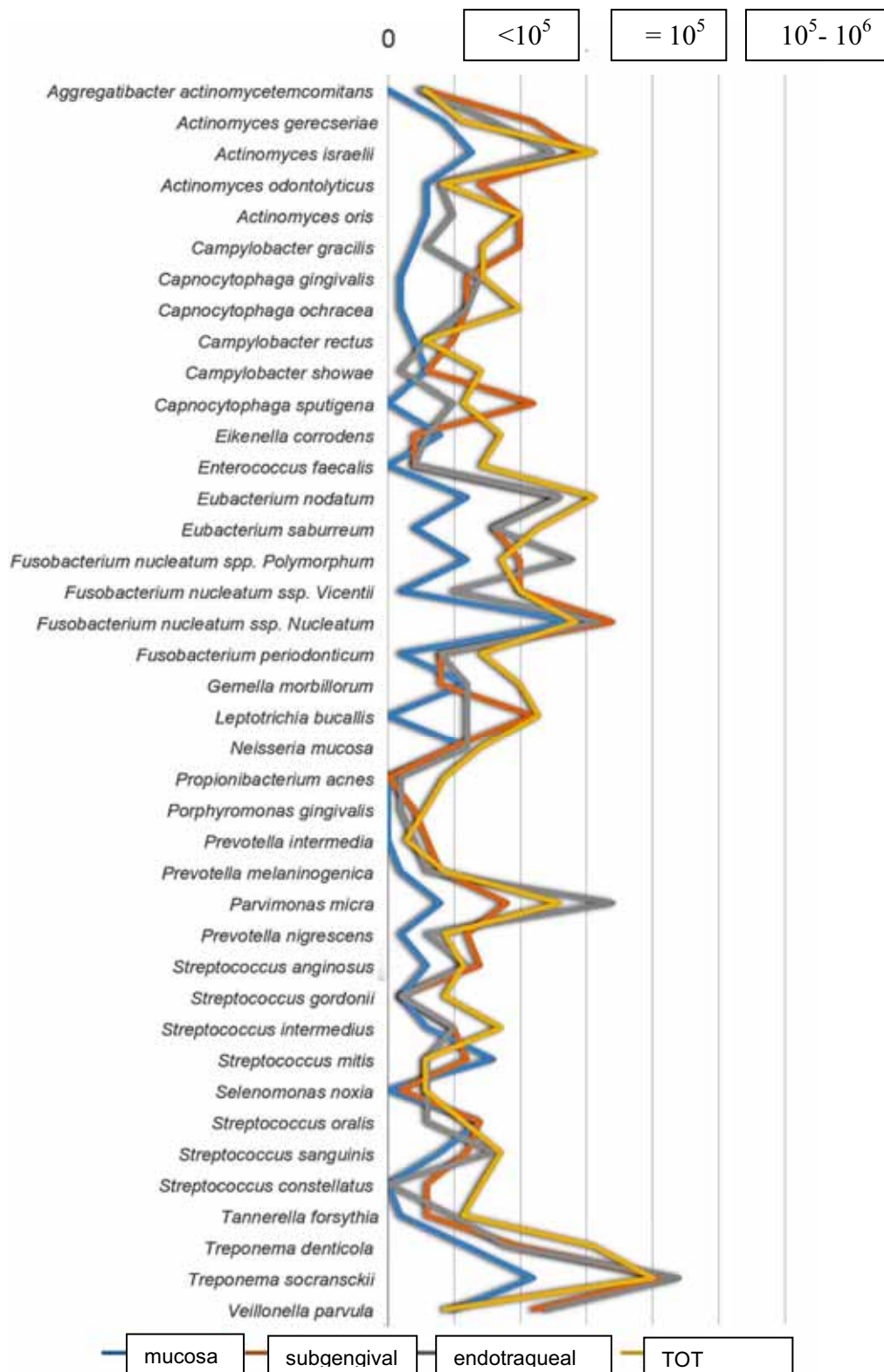


Figura 13 - Detecção e concentração de DNA das espécies após 12 h. As cores diferentes indicam as diferentes concentrações de DNA bacteriano em cada local, de acordo com o tempo de IOT (12 h).



Figura 14 - Detecção e concentração de DNA das espécies após 48 h. As cores diferentes indicam as diferentes concentrações de DNA bacteriano em cada local, de acordo com o tempo de IOT (48 h).

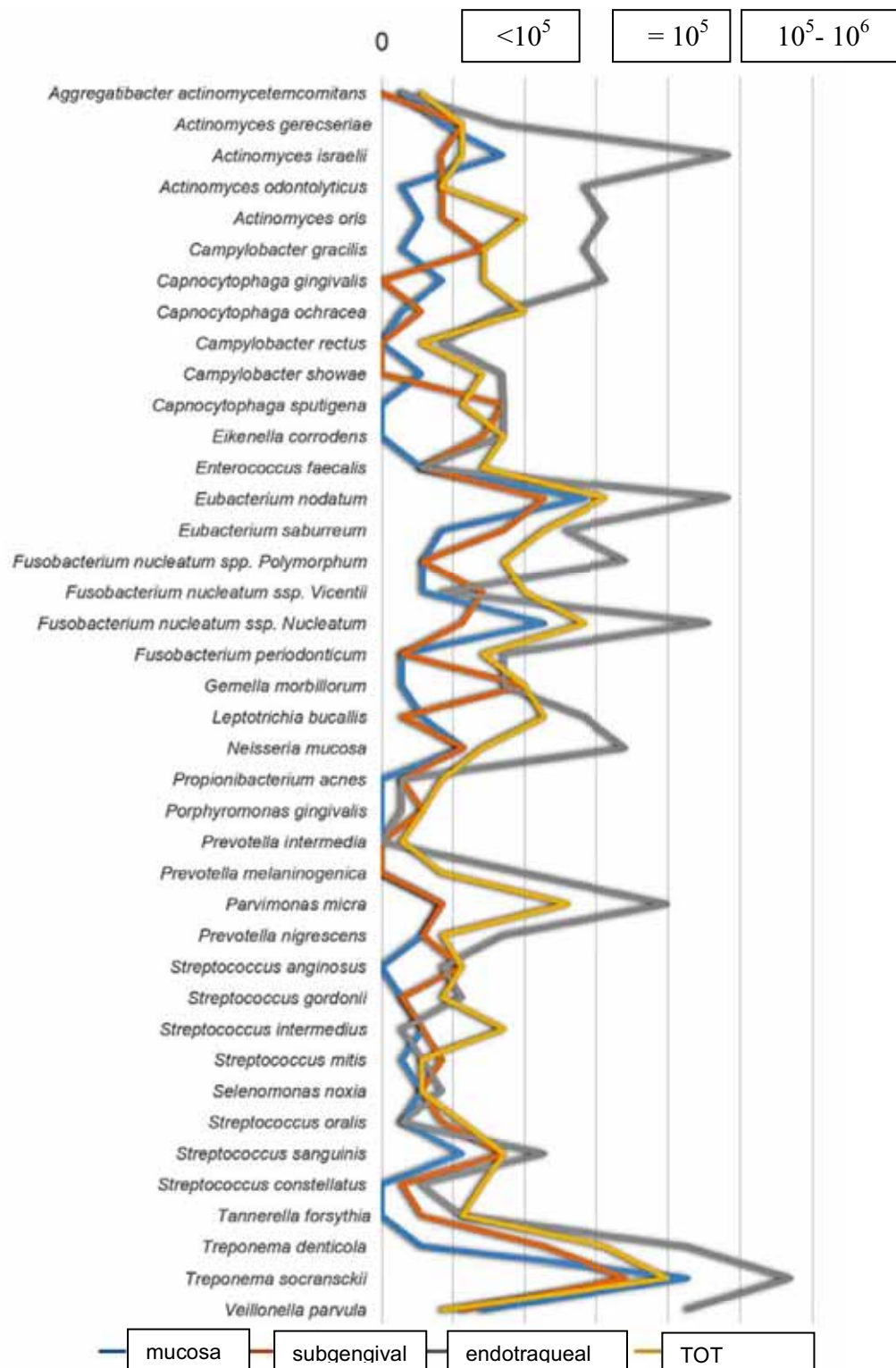


Figura 15 - Detecção e concentração de DNA das espécies após 96 h. As cores diferentes indicam as diferentes concentrações de DNA bacteriano em cada local, (1 = $< 10^5$, 2 = $= 10^5$, 3 = $10^5 - 10^6$, 4 = 10^6 , 5 = $> 10^6$), de acordo com o tempo de IOT (96 h).

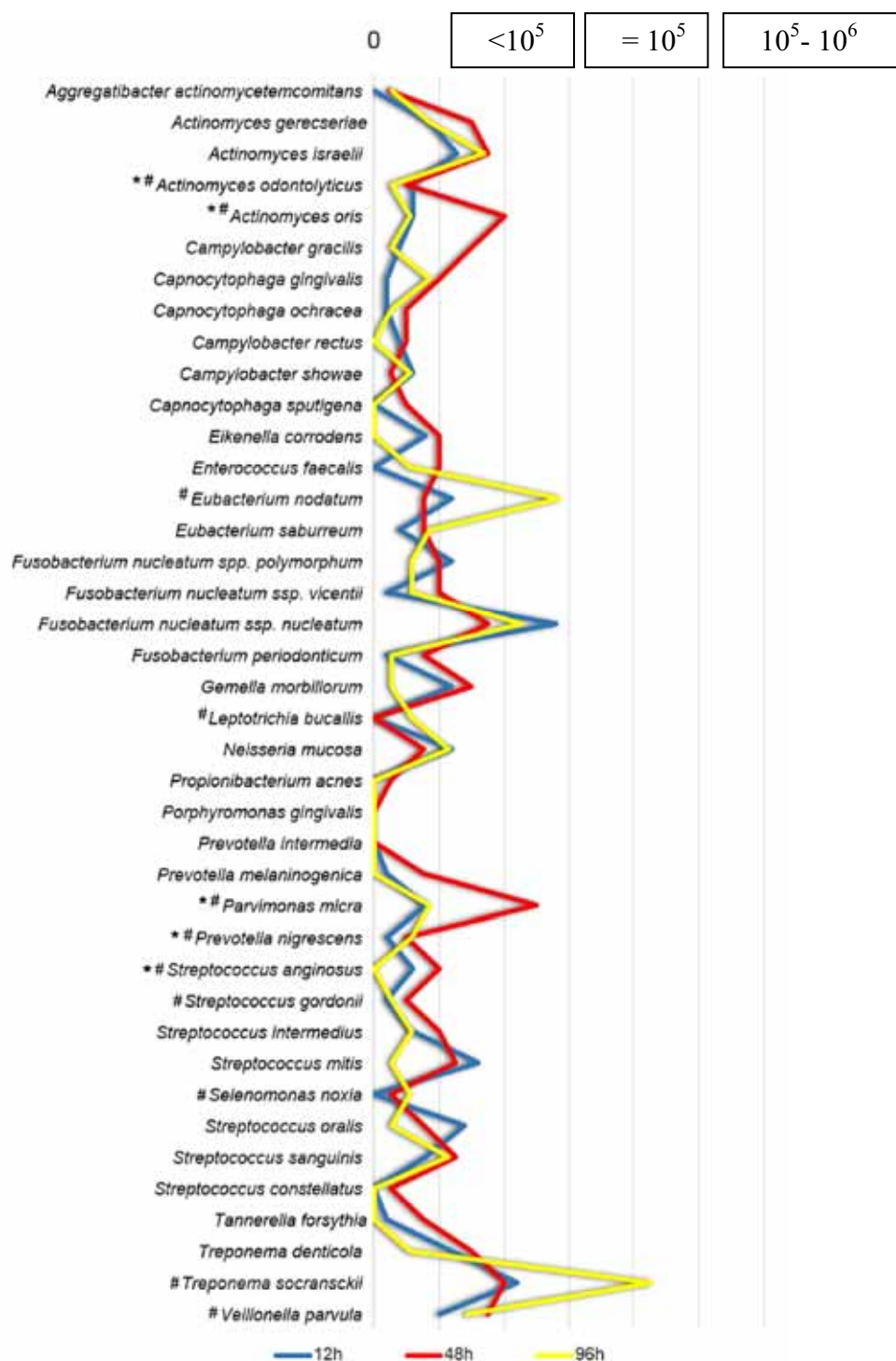


Figura 16 - Detecção de DNA das espécies bacterianas na mucosa oral nos diferentes tempos de coleta. As cores diferentes indicam as diferentes concentrações de DNA bacteriano, * diferença estatística do período de 12 h para 48 h de IOT. # diferença estatística do período de 48 h para 96 h, $p < 0.05$.



Figura 17 - Detecção de DNA das espécies bacterianas no espaço subgingival, nos diferentes tempos de coleta. As cores diferentes indicam as diferentes concentrações de DNA bacteriano, * diferença estatística do período de 12h para 48h de IOT. # diferença estatística do período de 48h para 96h, $p < 0.05$.

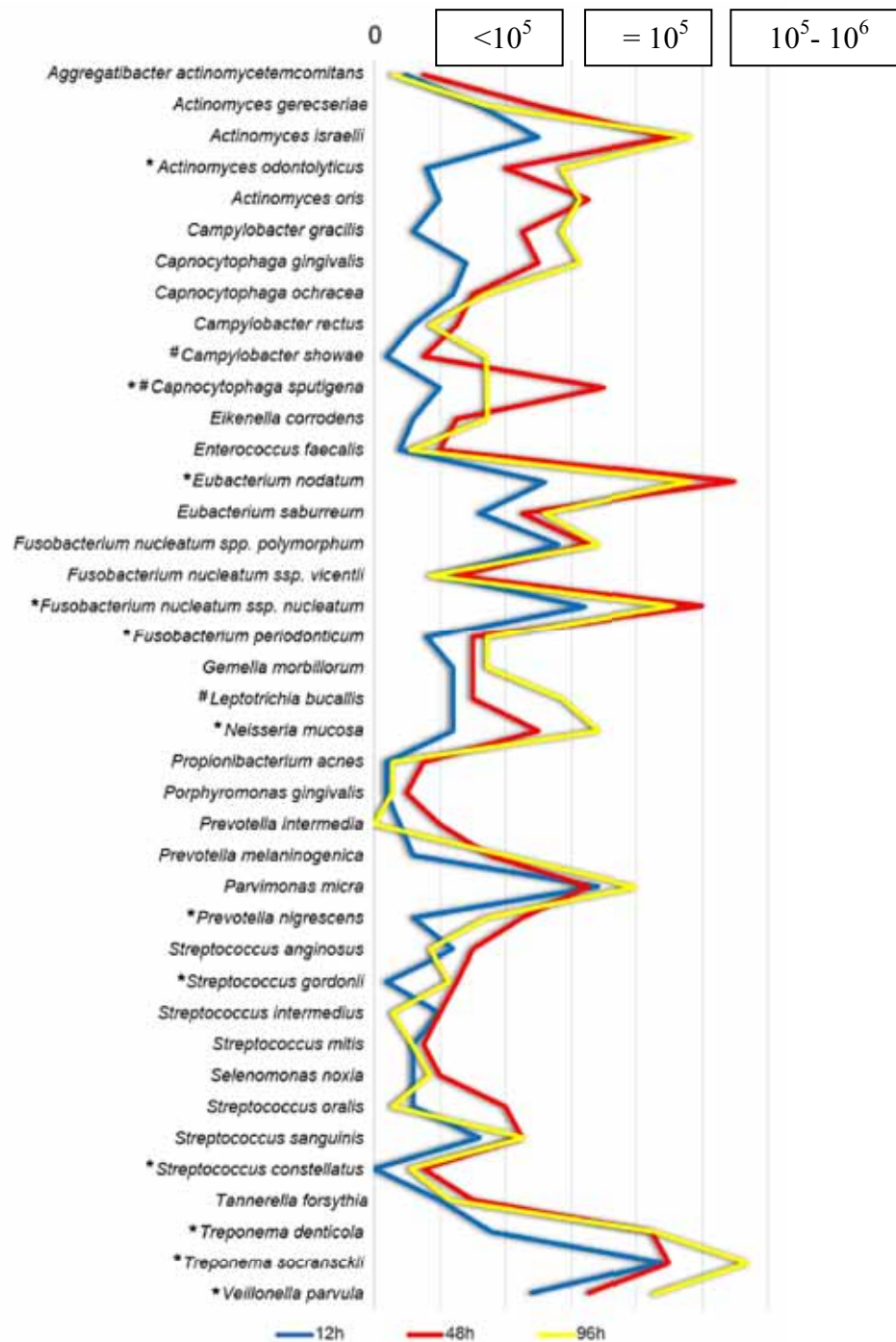


Figura 18 - Detecção de DNA das espécies bacterianas no BAL/aspirado endotraqueal, nos diferentes tempos de coleta. As cores diferentes indicam as diferentes concentrações de DNA bacteriano, no BAL/aspirado endotraqueal, * diferença estatística do período de 12 h para 48 h de IOT, # diferença estatística do período de 48 h para 96 h, $p < 0.05$.

O Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0.05$), foi utilizado para avaliar a associação entre PAVM com o DNA das espécies bacterianas, apresentado na tabela 2, abaixo.

Tabela 2 – Associação entre os casos de PAVM com a concentração de DNA das espécies bacterianas $p < 0.05$

Bacteria	Local de coleta	Tempo	P valor
<i>E faecalis</i>	mucosa oral	96 h	$p = 0.041$
<i>F periodonticum</i>	mucosa oral	96 h	$p = 0.044$
<i>G morbillorum</i>	mucosa oral	96 h	$p = 0.047$
<i>N mucosa</i>	mucosa oral	12 h	$p = 0.016$
<i>N mucosa</i>	mucosa oral	48 h	$p = 0.040$
<i>P acnes</i>	aspirado endotraqueal	48 h	$p = 0.039$
<i>P melaninogenica</i>	BAL	12 h	$p = 0.049$
<i>S Oralis</i>	espaco subgengival	12 h	$p = 0.049$
<i>S Oralis</i>	mucosa oral	48 h	$p = 0.047$
<i>S sanguinis</i>	aspirado endotraqueal	48 h	$p = 0.048$
<i>T denticola</i>	mucosa oral	48 h	$p = 0.046$
<i>T socranskii</i>	espaco subgengival	12 h	$p = 0.045$
<i>V parvula</i>	espaco subgengival	96 h	$p = 0.039$

5.3 Identificação de espécies bacterianas com hemocultura positiva

Para avaliar a associação de hemocultura positiva com o DNA das espécies bacterianas encontrado nos locais de coleta foi utilizado o Mann-Whitney Test ($p < 0.05$), apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Associação entre hemocultura+ com DNA das espécies bacterianas $p < 0.05$

Bacteria	Sítio de coleta	Tempo	P valor
<i>F nucleatum</i>	mucosa oral	12h	$p = 0.046$
<i>S mitis</i>	BAL	12h	$p = 0.038$
<i>T socranskii</i>	mucosa oral	12h	$p = 0.043$
<i>T socranskii</i>	espaco subgingival	12h	$p = 0.037$
<i>T socranskii</i>	BAL	12h	$p = 0.028$
<i>V parvula</i>	mucosa oral	12h	$p = 0.039$

Para avaliar a associação entre o sinal vital Febre (hipertermia) e hemocultura positiva; Febre e PAVM foi utilizado o Teste exato de Fisher ($p < 0.05$), conforme a tabela 4.

Tabela 4 – Associação entre febre e hemocultura positiva e pneumonia $p < 0.05$

Sinal Vital	Associação	P valor
Febre	Hemocultura positiva	$p = 0.038$
Febre	Pneumonia	$p = 0.033$

Não houve associação entre PAVM e hemocultura positiva.

6 DISCUSSÃO

A técnica Checkerboard DNA-DNA Hybridization, foi descrita pela primeira vez em 1994, por Socransky *et al.*, usando sondas específicas de 40 espécies bacterianas, que puderam determinar que a placa subgingival, contém espécies bacterianas em diferentes complexos, e estão associados à gravidade da doença periodontal.

A utilização desta técnica permite hibridizar um grande número de amostras de DNA utilizando sondas de DNA em uma única membrana (Socransky *et al.*, 2004). Ainda, este método permite identificar bactérias de difícil cultivo, uma vez que as bactérias não necessitam estar viáveis, mas apenas o seu DNA preservado (Socransky *et al.*, 2004).

Desta forma a utilização deste método permitiu compreender melhor a microbiota oral em pacientes intubados e sob VM, bem como, verificar se esta microbiota está presente no TOT e BAL, sendo possível avaliar a possibilidade de migração de espécies bacterianas por broncoaspiração, durante a VM.

PAVM é a causa mais comum de mortalidade nas UTIs, e está associada ao tempo de internação e de ventilação mecânica, elevando os custos hospitalares.

A VM por si só leva a um processo inflamatório devido ao stress celular pulmonar (Hammerschmidt *et al.*, 2004; Pugin *et al.*, 1998), entretanto, esse processo geralmente não ocorre em indivíduos saudáveis, com pulmões normais. No caso de lesão ou infecção prévia, a VM pode levar a inflamação e lesão do epitélio alveolar, podendo inclusive evoluir para injúria pulmonar aguda (Altemeier *et al.*, 2004; Frank *et al.*, 2002).

Johanson *et al.*, (1972); Bonten *et al.*, (1996), relataram que o primeiro passo para a instalação da doença é a colonização do trato respiratório com microrganismos potencialmente patogênicos, embora nem todos estes pacientes colonizados desenvolvam a PAVM. Por ser uma doença grave, a PAVM é acompanhada de uma extensa resposta inflamatória. Entretanto, no presente estudo, ao avaliar as hemoculturas, verificou-se que somente 50% foram positivas. Isto se deve ao fato que, por se tratar de pacientes críticos, muitos já estavam internados em outras unidades ou já estavam fazendo uso de antibioticoterapia profilática.

No entanto, Bonten *et al.*, (1996), sugerem que a infecção pulmonar não é refletida pela resposta inflamatória sistêmica ou que as culturas do lavado bronco alveolar (BAL) ou escovado bronco pulmonar (PSB), não são capazes de correlacionar a gravidade da infecção pulmonar. Ainda, Dauphinee e Karsan (2006), verificaram que a VM associada a infecção bacteriana resultou num aumento da inflamação pulmonar e sistêmica.

Normalmente, nas UTIs, o diagnóstico definitivo de pneumonia é realizado através da cultura do BAL, porém a antibioticoterapia empírica para PAVM é iniciada precocemente e, de acordo com a evolução da doença e sensibilidade do microrganismo, são realizadas diversas mudanças. Sendo assim, devido as dificuldades para o diagnóstico de PAVM, o tratamento com antibioticoterapia é empírico e muitas vezes excessivo (Morris *et al.*, 2009; Porzecanski e Bonten, 2006). Idealmente, a antibioticoterapia deve estar alinhada com a sensibilidade da espécie bacteriana isolada, entretanto, para que esta ocorra deve se obter amostras broncoscópicas, que elevam os custos e requerem profissional especializado (Zaccard *et al.*, 2009). De acordo com Rouby *et al.*, (1992), o “padrão ouro”, para o diagnóstico de pneumonia seria o histológico, entretanto, isto não é viável e nem desejável em pacientes críticos.

Assim, as dificuldades no diagnóstico de PAVM se devem a alguns fatores como: possibilidade de outras causas de resposta inflamatória sistêmica, uso prévio de antibiótico e ausência de métodos diagnósticos viáveis e precisos (Woske *et al.*, 2001). Segundo Wood *et al.*, (2005), apenas 39% de 299 pacientes com suspeita de PAVM, tiveram cultura positiva no BAL, sendo o diagnóstico clínico fundamental.

Clinicamente o diagnóstico de PAVM é definido diante da identificação de um infiltrado novo ou progressivo na imagem radiográfica de tórax, associado a pelo menos 2 de 3 critérios: febre, secreção pulmonar purulenta e leucocitose, além da ausculta pulmonar relacionada (Niederman, 2010). No presente estudo os parâmetros para o diagnóstico de PAVM foram: a evolução clínica, exames complementares como leucograma e RX de Tórax associados aos sinais, sintomas e exame físico, especialmente a ausculta pulmonar. Ainda, utilizou-se para coleta o mini-Bal que é um método eficaz com melhor custo-benefício quando realizado por fisioterapeutas e enfermeiros treinados.

Ainda, ao avaliar os resultados dos microrganismos encontrados nos diferentes locais de coleta microbiológica, verificou-se que alguns microrganismos que apresentaram maior carga de DNA no aspirado endotraqueal, também apresentaram maior carga destes microrganismos na mucosa oral, sulco gengival e tubo endotraqueal após a extubação, como seguem: *Treponema socransky* (12 h, 48 h e 96 h); *Parvimonas micra* (12 h, 48 h e 96 h); *Fusobacterium nucleatum ssp Nucleatum* (12 h e 96 h); *Actinomyces israelii* (12 h); *Eubacterium nodatum* (48 h e 96 h); *Streptococcus sanguinis* (48 h e 96 h). Após 96 h a concentração do DNA bacteriano dessas espécies aumentou significativamente, demonstrando uma mudança rápida tanto quantitativa como qualitativamente na microbiota da cavidade bucal e, principalmente do aspirado endotraqueal. Estes resultados de acordo com Feldeman *et al.* (1999), sugerem que as mudanças precoces na colonização da

orofaringe, pode ser um importante precursor para a colonização posterior das vias aéreas inferiores.

Ainda de acordo com Brennan *et al.*, (2004), a colonização da orofaringe parece ser o precursor do subsequente desenvolvimento da PAVM.

Treponema socranskii é uma espiroqueta que possui lipopolissacarídeo e produtos metabólicos como, sulfeto de hidrogênio, que são potencialmente tóxicos para as células do hospedeiro (Chan EC, McLaughlin, 2000), além disto, Treponemas são bactérias que se fixam as proteínas da membrana basal bem como a outros substratos através de ligações específicas, resultando em morte celular e citotoxicidade (Fenno, Mc Bridge, 1998; Chan EC, McLaughlin, 2000). Estas espiroquetas se ligam aos eritrócitos acompanhados por aglutinação e lise. A hemólise libera hemina que é sequestrada, por uma proteína do receptor da membrana externa na bainha da espiroqueta. Além disto, estas bactérias possuem capacidade de se locomoverem através de ambientes viscosos, o que pode facilitar sua penetração no tecido conjuntivo. (Chan EC, McLaughlin, 2000).

Treponema socranskii e *Fusobacterium nucleatum ssp. Nucleatum* são bactérias Gram-negativas. Estas bactérias possuem endotoxinas em sua parede celular. Quando circulantes, as endotoxinas interagem com células endoteliais da camada interna dos vasos sanguíneos, prejudicando as funções endoteliais (Huet et al., 2011; Dauphinne, Karsan, 2006). Entretanto, a função endotelial é um fator importante na patogênese de sepse e de outras doenças inflamatórias (Huet et al., 2011; Matsuda, Hattori, 2007).

Streptococcus sanguinis é um anaeróbio facultativo Gram-positivo e um frequente patógeno da endocardite infecciosa e de infecção vascular severa, uma vez que *Streptococcus sanguinis*, possui fatores de virulência como: manutenção de síntese da parede celular, síntese de

aminoácidos e ácido nucleico e capacidade de sobreviver em condições de anaerobiose (Paik *et al.*, 2005).

A identificação de bactérias anaeróbias, não esporuladas, bacilo Gram-positivo, como *Eubacterium nodatum* é de difícil cultivo e crescimento lento, bioquimicamente inerte e fastidioso (Lau *et al.*, 2004). Assim não foram encontrados estudos sobre os fatores de virulência deste microrganismo, não sendo possível saber seu papel na patogênese da PAVM.

Parvimonas micra é um anaeróbio facultativo Gram-positivo, comum na microbiota bucal mas que foi encontrado também no lavado broncoalveolar, no presente estudo. Poetter *et al.*, (2014), verificaram em caso de enfizema pleural associado a *Parvimonas micra*, que foi detectado na secreção purulenta coletada. Os autores correlacionaram a infecção pleural com a falta de higiene bucal.

Verificou-se que as espécies *Actinomyces israelii*; *Actinomyces odontolyticus*, *Actinomyces oris*, *Campylobacter gracilis*, *Capnocytophaga gingivalis*; e *Neisseria mucosa*, aumentaram somente no aspirado endotraqueal e no TOT, mantendo baixas concentrações de DNA nos locais de coleta da cavidade bucal.

Actinomyces é uma bactéria anaeróbia Gram-positiva sendo a *Actinomyces israelii*; uma espécie comum nas infecções humanas (Pulverer *et al.*, 2003; Sharkawy, 2007). Entretanto, é uma bactéria com baixo potencial de patogenicidade; sendo assim, a infecção ocorre quando existe lesão de mucosa ou presença de co-patogenos (Vorasubin *et al.*, 2012). As lesões nas mucosas como infecções e traumas, permitem o acesso das bactérias aos tecidos subcutâneos enquanto que os co-patógenos reduzem a tensão de oxigênio local, inibem a defesa do hospedeiro e assim criam um ambiente propício a proliferação de *Actinomyces*. Assim, no presente estudo, existia a lesão, provocado pelo TOT, toda manipulação e também a presença dos co-patógenos que podem ter favorecido a proliferação deste microrganismo.

Capnocytophaga gingivalis é uma bactéria Gram-negativa e atua como um co-agregador de *Actinomyces israelii*, uma vez que produz diferentes enzimas facilitadoras para este micorganismo (Spratt *et al.*, 1996).

Campylobacter gracilis e *Neisseria mucosa* são anaeróbios Gram-negativos, portanto liberam endotoxinas (LPS) que promovem morte de células endoteliais (Becerra *et al.*, 2011), além de ser capaz de induzir a conversão de células endoteliais em fibroblastos ativadas, também conhecidos como miofibroblastos (Echeverria *et al.*, 2013).

Verificou-se ainda que no presente estudo a quantidade de DNA bacteriano foi superior a medida em que o tempo passou. De acordo com Chastre e Fagon (2002), 58% dos patógenos causadores de PAVM são bactérias Gram-negativas, sendo o micorganismo mais frequente *Pseudomonas aeruginosa* (24%), *Enterobacteriaceae* (14%), *Haemophilus spp.* (10%) e *Acinetobacter spp.* (8%). Pneumonias causadas por patógenos Gram-positivas, de acordo com estes autores, também foram frequentes sendo os micorganismos relacionados: *S. aureus* (20%), *Streptococcus spp.* (8%) e *Streptococcus pneumoniae* (4%). De acordo com Brennan *et al.*, 2004, estudos que avaliam a microbiota da cavidade bucal e pulmões, mostram que a incidência de PAVM varia de 9 a 35%.

Ainda, Zaccard *et al.* (2009), avaliando amostras coletadas dos pulmões, encontraram um total de 405 bactérias isoladas, sendo que as mais frequentes isoladas foram *Staphylococcus aureus* (27,6%), *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina (6,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (16,8%) e *Haemophilus Influenzae* (15,5%) (Zaccard *et al.*, 2009).

No presente estudo, ao associar a microbiota oral com a dos pulmões e PAVM houve significância estatística para: *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemella morbillorum*, *Neisseria*

mucosa, Propionibacterium acnes, Prevotella melaninogenica, Streptococcus oralis, Streptococcus oralis, Streptococcus sanguinis, Treponema denticola, Treponema socranskii, Veillonella parvula.

No presente estudo, verificou-se que não houve associação entre a PAVM e hemocultura positiva. Entretanto, houve associação entre febre e hemocultura positiva e entre febre e Pneumonia.

A hemocultura positiva apontou para *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*, embora não tenha demonstrado associação entre PAVM e hemocultura positiva.

Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária apontam Staphylococcus epidermidis, como um dos principais causadores de infecções de cateteres e próteses e o mais frequente microrganismo encontrado em hemoculturas. Entre seus fatores de virulência a produção de um polissacarídeo é o principal componente na formação do biofilme o que dificulta a ação do sistema imune do hospedeiro. As enterotoxinas estafilocócicas (SE) atuam como super antígenos estimulando de forma contínua o sistema imune, causando intoxicação (Brasil, 2010).

Vandecandelaere *et al.* (2012), identificaram que 70% das bactérias presentes no biofilme do TOT são típicos da microbiota oral. Os principais patógenos identificados no início da PAVM são *Gram-positivos, S. epidermidis* e *S. aureus*. A expressão dos fatores de virulência do *S. aureus* está relacionada a adesão celular e aquisição de nutrientes devido a proteína de ligação do fibrinogênio, fibronectinacolágeno e coagulase; fatores envolvidos na evasão da resposta imune pelo hospedeiro pela produção de enterotoxinas; invasão e penetração celular, devido a toxina hemolisina. Também presente nas infecções nosocomiais, *P. aeruginosa*, Gram negativo aeróbio estrito expressa seus fatores de virulência como adesão, facilitada pelos flagelos e fimbrias; capacidade de invasão pela ação de toxinas, exoenzimas e formação de biofilme devido sua

adaptação ao micro ambiente. Nas infecções nosocomiais frequentemente pode-se identificar *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA) e *Pseudomonas aeruginosa*, *extended-spectrum β -lactamases* (ESBL), que são de difícil tratamento

A frequência de cultura positiva em PAVM varia de (8 - 20%). Alguns estudos apontam para o fato de que bacteremia em pacientes críticos, nem sempre está associada a PAVM e 50% dos pacientes com hemocultura positiva podem ter infecções adicionais. Estudo de Luna *et al.* (1999), apontam que hemocultura positiva em pacientes com PAVM são usadas para suspeitar de outras infecções simultâneas, quando o microrganismo isolado no sangue não é o mesmo isolado em secreções pulmonares (Ioanas *et al.*, 2001).

A associação de hemocultura positiva com o DNA das espécies bacterianas nas primeiras 12 h de IOT, foi identificada em nossa pesquisa, para as seguintes espécies: *Fusobacterium nucleatum spp. Polymorphum*, *Streptococcus mitis*, *Treponema socranskii*, *Veillonella parvula*, detectadas tanto na mucosa oral quanto no BAL, estes dados levam a inferir que a microbiota oral rapidamente pode invadir as vias aéreas inferiores e favorecer a PAVM, entretanto, estes microrganismos não foram os mesmos da hemocultura positiva.

Vários fatores como, temperatura, pH, fluxo salivar, nutrientes, aderência e aglutinação, afetam o crescimento de microrganismos na cavidade oral, principalmente em pacientes críticos sob VM por TOT, sendo que o biofilme dental nesses pacientes aumenta com o tempo de internação e VM (Morais *et al.*, 2006; Rosenthal *et al.*, 2006).

No presente estudo as condições de higiene oral foram avaliadas com base na presença de tártaro visível, aspecto da língua saburrosa, presença de sialorréia intensa ou xerostomia, lesões em mucosas, língua e lábios, sangramento e dentição. Constatou-se que quanto maior o tempo de IOT, maior a concentração de carga bacteriana

para espécies identificadas nos diferentes locais de coleta, sendo no espaço subgengival, BAL e aspirado endotraqueal identificadas as maiores concentrações de carga bacteriana.

Quando analisados separadamente os locais de coleta em relação ao tempo de IOT, observou-se maior concentração de carga bacteriana, em decorrência ao maior tempo de IOT.

A manutenção da HO, efetivação e adaptação de protocolos que direcionem a HO de forma adequada e padronizada por todos os profissionais promovem resultados satisfatórios e diminuição da carga microbiana da microbiota oral. (Brennan *et al.*, 2004; Bahrani-Mougeot *et al.*, 2007; Abidia, 2007).

O enfermeiro participa da avaliação das condições da saúde bucal do paciente em IOT e VM, elaborando diagnósticos de enfermagem como, risco para infecção e dentição alterada, auxiliando na realização das prescrições e intervenções de enfermagem, além disto, avaliam os resultados sobre a assistência prestada ao paciente e diante de alterações, informam a equipe multiprofissional.

A microbiota oral nos pacientes críticos muda com o decorrer do tempo de internação e IOT e passa a ser predominantemente de Gram-negativos, o uso de antimicrobianos, especialmente a clorexidina 0,12% é benéfico na redução desta microbiota e conseqüentemente na prevenção de PAVM (Munro, Grap, 2004; Amaral *et al.*, 2009; Heo *et al.*, 2008; Koeman, *at al.*, 2006).

Além da higiene bucal, outras medidas preventivas como elevação do decúbito a 30⁰, aferição da pressão no *cuff* da cânula orotraqueal, podem diminuir a incidência de infecções. Medidas como aspiração oral, hidratação da mucosa e lábios, podem diminuir os fatores de risco para PAVM (Chlebicki, Safdar, 2007; Sona *et al.*, 2009; Silvestri *et al.*, 2009).

Espera-se que a integração da medicina intensiva, odontologia e enfermagem, seja estimulada pelos resultados desta

pesquisa com a inserção do cirurgião dentista no ambiente hospitalar, especialmente nas unidades de terapia intensiva. É necessário que as políticas públicas de assistência ao paciente crítico promovam a inclusão do cirurgião-dentista nas UTIs, em atenção ao que prevê a RDC 7/2010 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Art. 18. “Devem ser garantidos, por meios próprios ou terceirizados, assistência odontológica à beira do leito”, e desta forma, proporcionar melhorias nos indicadores de saúde, prevenção de infecção hospitalar e consequente diminuição da morbimortalidade, do tempo de internação e custos. Implementando um modelo de atendimento multiprofissional em alta complexidade, buscando segurança e qualidade nas UTIs dos hospitais de nosso país.

6 CONCLUSÃO

Concluiu-se que:

- a) Verificou-se presença de bactérias da cavidade bucal no tubo orotraqueal e BAL; Encontrou-se carga de DNA bacteriano em relação à própria mucosa oral e espaço subgengival;
- b) O perfil microbiano nos locais de coleta foi proporcional ao tempo: quanto maior o tempo de IOT, maior a carga bacteriana identificada em todos os locais de coleta, especialmente no BAL;
- c) Houve associações entre PAVM com, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium periodonticum*, *Gemella morbillorum*, *Neisseria mucosa*, *Propionibacterium*, *Prevotella melaninogenica*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Treponema denticola*, *Treponema socransckii*, *Veillonella parvula*;
- d) A hemocultura foi positiva em (50%) dos casos, sendo isolados, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermides* e *Pseudomonas aeruginosa*;

- e) A hemocultura positiva mostrou associação com o DNA das espécies bacterianas *Fusobacterium nucleatum* spp. *Polymorphum*, e *Streptococcus mitis*, *Treponema socranskii*, *Veillonella parvula*. Houve associação entre febre e hemocultura; febre e pneumonia; e não houve associação entre PAVM e hemocultura positiva.

8 REFERÊNCIAS*

Abidia RF. Oral care in intensive Care Unit: a review. *J Contemp Dent Pract.* 2007 Jan;8(1):76-82.

Altemeier WA, Matute-Bello G, Frevert CW, Kawata Y, Kajikawa O, Martin TR, et al. Mechanical ventilation with moderate tidal volumes synergistically increases lung cytokine response to systemic endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004, Sep;287(3):L533–42.

Amaral SM, Cortês AQ, Pires FR. Nosocomial pneumonia: importance of the oral environment. *J Bras Pneumol.* 2009;35(11):1116-24.

Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Barbuto S, Brennan MT, Noll J, et al. Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2007 May;45(5):1588-93.

Becerra A, Echeverria C, Varela D, Sarmiento D, Armisen R, Nuñez-Villena F, et al. Transient receptor potential melastatin 4 inhibition prevents lipopolysaccharide-induced endothelial cell death. *Cardiovasc Res.* 2011 Sep 1;91(4):677-84.

Beraldo CC, Andrade D. Oral hygiene with chlorhexidine in preventing pneumonia associated with mechanical ventilation. *J Bras Pneumol.* 2008;34(9):707-14.

Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol.* 2008 Oct;23(5):384-90.

Bonten MJ, Bergmans DC, Ambergen AW, de Leeuw PW, van der Geest S, Stobberingh EE, et al. Risk factors for pneumonia, and colonization of respiratory tract and stomach in mechanically ventilated ICU patients. *Am. J Respir Crit Care Med.* 1996 Nov;154(5):1339–46.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Brasil, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução nº 7 de 24 de fevereiro de 2010. Dispõe sobre os requisitos mínimos para funcionamento de Unidades de Terapia Intensiva e dá outras providências. Acesso em 13 de maio de 2014. Disponível em http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0007_24_02_2010.html.

Brennan MT, Bahrani-Mougeot F, Fox PC, Kennedy TP, Hopkins S, Boucher RC, et al. The role of oral microbial colonization in ventilator-associated pneumonia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(6):665-72.

Camargo LF, De Marco FV, Barbas CS, Hoelz C, Bueno MA, Rodrigues M Jr, et al. Ventilator associated pneumonia: comparison between quantitative and qualitative cultures of tracheal aspirates. *Crit Care.* 2004 Dec;8(6):R422-30.

Cavalcanti M, Valencia M, Torres A. Respiratory nosocomial infections in the medical intensive care unit. *Microbes Infect.* 2005 Feb;7(2):292-301.

Chan EC, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol.* 2000:Feb;15(1)1-9.

Chan EY, Ruest A, Meade MO, Cook DJ. Oral decontamination for prevention of pneumonia in mechanically ventilated adults: systematic review and meta-analysis. *BMJ.* 2007 Apr 28;334(7599):889.

Chastre J, Fagon J. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Apr 1;165(7):867-903.

Chlebicki MP, Safdar N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care Med.* 2007;35(2):595-602.

Cutler CJ, Davis N. Improving oral care in patients receiving mechanical ventilation. *Am J Crit Care.* 2005;14(5):389-94.

Dauphinee SM, Karsan A. Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells. *Lab Invest.* 2006 Jan;86(1):9-22.

Echeverria C, Montorfano I, Sarmiento D, Becerra A, Nuñez-Villena F, Figueroa XS, et al. Lipopolysaccharide induces a fibrotic-like phenotype in endothelial cells. *J Cell Mol Med.* 2013 Jun;17(6):800-14.

Fagon JY, Chastre J, Rouby JJ. Is bronchoalveolar lavage with quantitative cultures a useful tool for diagnosing ventilator-associated

pneumonia? *Crit Care*. 2007;11(2):123.

Feldman C, Kassel M, Cantrell J, Kaka S, Morar R, Goolam Mahomed A, et al. The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. *Eur Respir J*. 1999 Mar;13(3):546-51.

Fenno J, McBride B. Virulence factors of oral treponemes. *Anaerobe* 1998 Feb;4(1):1-17.

Frank JA, Gutierrez JA, Jones KD, Allen L, Dobbs L, Mathay MA. Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs. *Am J Resp Crit Care Med*. 2002 Jan 15;165(2):242-9.

Hammerschmidt S, Kuhn H, Grasenack T, Gessner C, Wirtz H. Apoptosis and necrosis induced by cyclic mechanical stretching in alveolar type II cells. *Am J Resp Cell Mol Biol*. 2004 Mar;30(3):396-402.

Heo SM, Haase EM, Lesse AJ, Gill SR, Scannapieco FA. Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. *Clin Infect Dis*. 2008;47(12):1562-70.

Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2011 Jan 1;16:1986-95.

Ioanas M, Ferrer R, Angrill J, Torres A. Microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J*. 2001;17(4):791-801.

Johanson WG Jr, Pierce AK, Sanford JP, Thomas GD. Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Am Intern Med*. 1972 Nov;77(5):701-6.

Joseph NM, Sistla S, Dutta TK, Badhe AS, Parija SC. Ventilator-associated pneumonia: a review. *Eur J Intern Med*. 2010 Oct;21(5):360-8.

Kahn S, Mangialardo ES, Garcia CH, Namen FN, Galan JJ, Machado WAS. Controle de infecção oral em pacientes internados: uma abordagem direcionada aos médicos intensivistas e cardiologistas. *Ciênc Saúde Coletiva*. 2010;15(1):1819-26.

Koeman M, van der Ven AJ, Hak E, Joore HC, Kaasjager K, Smet AG, et al. Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Resp Crit Care Med*. 2006;173(12):1348-55.

Kollef MH, Morrow LE, Niederman MS, Leeper KV, Anzueto A, Benz-Scott L, et al. Clinical characteristics and treatment patterns among patients with ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2006;129(5):1210-8.

Kollef MH. Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med*. 2004;32(6):1396-405.

Lau SK, Woo PC, Fung AM, Chan KM, Woo GK, Yuen KY. Anaerobic, non-sporulating, Gram-positive bacilli bacteraemia characterized by 16S rRNA gene sequencing. *J Med Microbiol*. 2004 Dec;53(Pt 12):1247-53.

Luna CM, Videla A, Mattera J, Vay C, Famiglietti A, Vujacich P, et al. Blood cultures have limited value in predicting severity of illness and as a diagnostic tool in ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 1999 Oct;116(4):1075-84.

Matsuda N, Hattori Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J Smooth Muscle Res*. 2007 Aug;43(4):117-37.

Morais TM, Silva A, Avia LR, Souza PH, Knobel E, Camargo LF. A importância da atuação odontológica em pacientes internados em unidade de terapia intensiva: revisão. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2006;18(4):412-7.

Morris AC, Kefala K, Simpson AJ, Wilkinson TS, Everingham K, Kerslake D, et al. Evaluation of diagnostic methodology on the reported incidence of ventilator-associated pneumonia. *Thorax* 2009 Jun;64(6):516-22.

Munro CL, Grap MJ. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. *Am J Crit Care*. 2004 Jan;13(1):25-33.

Needleman IG, Hirsch NP, Leemans M, Moles DR, Wilson M, Ready DR, et al. Randomized controlled trial of toothbrushing to reduce ventilator-associated pneumonia pathogens and dental plaque in a critical care unit. *J Clin Periodontol*. 2011;38(3):246-52.

Niederman MS. The argument against using quantitative cultures in clinical trials and for the management of ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2010 Aug;51(1):S93-9.

Paik S, Senty L, Das S, Noe JC, Munro CL, Kitten T. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun*. 2005 Sep;73(9):6064-74.

Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis*. 2007;13(6):508-12.

Poetter C, Pithois C, Caty S, Petit V, Combier JP, Mourtialon P, et al. Hiding behind confusion: pleural empyema caused by parvimonas micra. *Surg Infect. (Larchmt)*. 2014 Jun;15(3):356-7.

Porzecanski I, Bowton DL. Diagnosis and treatment of ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2006 Aug;130(2):597-604.

Pugin J, Dunn I, Jolliet P, Tassaux D, Magnenat JL, Nicod LP, et al. Activation of human macrophages by mechanical ventilation in vitro. *Am J Physiol*. 1998 Dec;275(6 Pt 1):L1040-50.

Pulverer G, Schtt-Gerowitt H, Schaal KP. Human cervico facial actinomycoses: microbiological data for 1997 cases. *Clin Infect Dis* 2003; 37(4):490-7.

Raghavendran K, Mylotte JM, Scannapieco FA. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. *Periodontol*. 2000 2007;44:164-77.

Rello J. Bench-to-bedside review: Therapeutic options and issues in the management of ventilator-associated bacterial pneumonia. *Crit Care*. 2005 Jun;9(3):259-65.

Rosenthal VD, Maki DG, Salomao R, Moreno CA, Mehta Y, Higuera F, et al. Device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. *Ann Intern Med*. 2006;145(8):582-91.

Rouby JJ, De Lassale EM, Poete P, Nicolas MH, Bodin L, Jarlier V, et al. Nosocomial bronchopneumonia in the critically ill. Histologic and bacteriologic aspects. *Am Rev Respir Dis*. 1992 Oct;146(4):1059-66.

Safdar NMD, Crnich CJ, Maki DG. The Pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *respir care*. 2005;50(6):725-39.

Scannapieco FA, Stewart EM, Mylotte JM. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med*. 1992 Jun;20(6):740-5.

Scannapieco FA. Pneumonia in nonambulatory patients. The role of oral bacteria and oral hygiene. *J Am Dent Assoc*. 2006;137 Suppl:21S-25S. Erratum in: *J Am Dent Assoc*. 2008;139(3):252.

Sharkawy AA. Cervicofacial actinomycosis and mandibular osteomyelitis.

Infect Dis Clin North Am. 2007 Jun;21(2):543–56, viii.

Silvestri L, van Saene HK, Milanese M, Zei E, Blazic M. Prevention of ventilator-associated pneumonia by use of oral chlorhexidine. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30(1):101-2.

Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Diretrizes brasileiras para tratamento das pneumonias adquiridas no hospital e das associadas à ventilação mecânica. *J Bras Pneumol*. 2007;33(1):S1-30.

Socransky SS, Haffajee AD, Smith C, Martin L, Haffajee JA, Uzel NG, et al. Use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Dec;19(6):352-62.

Sona CS, Zack JE, Schallom ME, McSweeney M, McMullen K, Thomas J, et al. The impact of a simple, low-cost oral care protocol on ventilator-associated pneumonia rates in a surgical intensive care unit. *J Intensive Care Med*. 2009;24(1):54-62.

Spratt BG, Zhou J, Taylor M, Merrick MJ. Monofunctional biosynthetic peptidoglycan transglycosylases. *Mol Microbiol*. 1996 Feb;19(3):639-40

Tantipong H, Morkchareonpong C, Jaiyindee S, Thamlikitkul V. Randomized controlled trial and meta-analysis of oral decontamination with 2% chlorhexidine solution for the prevention of ventilator-associated pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29(2):131-6.

Vandecandelaere I, Matthijs N, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Vosters P, De Bus L, et al. Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. *PLoS One*. 2012;7(6):e38401.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):282-90.

Vorasubin N, Wu AW, Day C, Suh JD. Invasive sinonasal actinomycosis: case report and literature review. *Laryngoscope*. 2013 Feb;123(2):334-8.

Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, Samsa GP, Brown V, Niederman MS. Microbiology of ventilator-associated pneumonia compared with that of hospital-acquired pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007;28(7):825-31.

Wood GC, Mueller EW, Croce MA, Boucher BA, Hanes SD, Fabian TC. Evaluation of a clinical pathway for ventilator-associated pneumonia:

changes in bacterial flora and the adequacy of empiric antibiotics over a three-year period. *Surg Infect (Larchmt)*. 2005;6(2):203-13.

Woske HJ, Röding T, Schulz I, Lode H. Ventilator-associated pneumonia in a surgical intensive care unit: epidemiology, etiology and comparison of three bronchoscopic methods for microbiological specimen sampling. *Crit Care*. 2001;5(3):167-73.

Zaccard CR, Schell RF, Spiegel CA. Efficacy of bilateral bronchoalveolar lavage for diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *J Clin Microbiol*. 2009 Sep;47(9):2918-24.

APÊNDICE A – Ficha de Anamnese

Paciente _____ Nº _____ Data Internação ___ / ___ / ___

HD _____

1ª Coleta POI – (até 12H) IOT- Data ___ / ___ / ___

Cone de papel ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

Swab ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

Secreção traqueal ()

ASPECTO _____

Soro ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

Hemocultura () LOCAL _____

2ª Coleta após 48H - IOT- Data ___ / ___ / ___

Cone de papel ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

Swab ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

Secreção traqueal ()

ASPECTO _____

Soro ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

3ª Coleta após 96H - IOT- Data ___ / ___ / ___

Cone de papel ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

Swab ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

Secreção traqueal ()

ASPECTO _____

Soro ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

4ª coleta- Extubação () Data ___ / ___ / ___

SWAB -cânula ()

QUANTIDADE/ LOCAL _____

HISTÓRICO

I- Identificação

INICIAIS: _____ Idade: _____

II- Antecedentes pessoais (caso seja informado)

Alergias: Sim Não Qual: _____

Diabetes Mellitus: Sim Não

HAS Sim Não

Dislidemia Sim Não

Doença Pulmonar Obstrutiva CrônicaSim Não

AnemiaSim Não

Acidente Vascular Cerebral.....Sim Não

CâncerSim Não

CIRURGIAS: _____

Doenças infecciosas Sim Não Qual? _____

Outras _____ doenças/Observações:

III- Hábitos

Tabagismo Sim Não.

Etilismo Sim Não.

EXAME FÍSICO

I- Sinais Vitais

DATA ___/___/___ Temperatura: ___°C FC: ___ bpm. FR: ___ mpm.

PA: _____ mmHg Sat O²: _____ FiO² _____ Modo Vent: _____

DATA ___/___/___ Temperatura: ___°C FC: ___ bpm. FR: ___ mpm.

PA: _____ mmHg Sat O²: _____ FiO² _____ Modo Vent: _____

DATA ___/___/___ Temperatura: ___°C FC: ___ bpm. FR: ___ mpm.

PA: _____ mmHg Sat O²: _____ FiO² _____ Modo Vent: _____

II- Avaliação dos sistemas:

Neurológico: Sedação: Sim Não. ECG: _____

Cavidade oral:

Mucosa, lábios, língua, dentição:

Mucosa:

Corada() Hipocorada () Sialorréia () Halitose ()

Língua saburrosa ()

Higiene Oral:

satisfatória insatisfatória

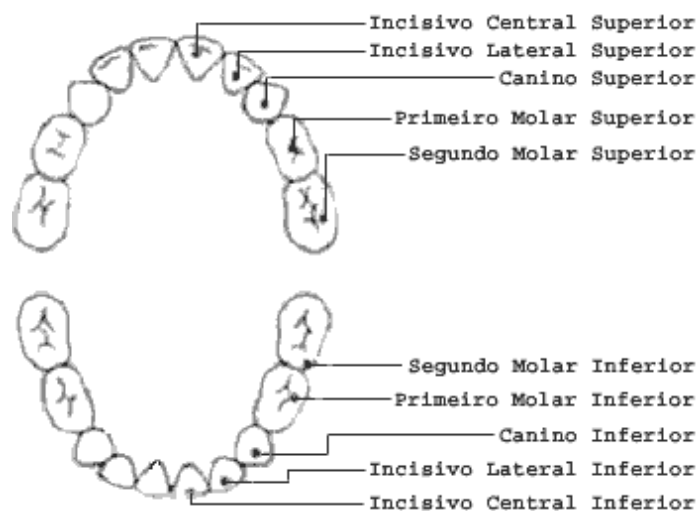
Presença de tártaro: Sim Não Ulceração: Sim Não

Sangramento: Sim Não Lesões: _____

Dentição natural (quantos): _____

Uso de prótese dentária: Sim Não Superior () Inferior ()

Anormalidades: _____



Pescoço: Gânglios: Palpáveis Não-palpáveis

Tórax e Sistema Pulmonar:

Tórax simétrico (..) Tórax assimétrico () **Expansão Bilateral** ()

Murmúrios vesiculares: () Presentes () Diminuídos () Ausentes

Obs: _____

Ruídos adventícios: () Ausentes () Presentes Especificar: _____

Sistema Cardiovascular:

() Normocárdico () Taquicárdico () Bradicárdico

Ritmo: () Regular () Irregular ()

Sopros _____

Pulsos:

MMSS: () Presentes () Ausentes

Obs: _____

MMII: () Presentes () Ausentes

Obs: _____

Perfusão periférica: () Normal () Diminuída

Obs: _____

Sistema Gastrointestinal:

Alimentação: () Gastrostomia () SNE Outros: _____

Abdome:

()Plano ()Globoso ()Flácido ()Rígido ()Timpânico ()Maciço ()Indolor à palpação ()Doloroso à palpação local: _____

RHA: Presentes Diminuídos Ausentes _____

Colostomia _____ **Outros:** _____

Sistema Geniturinário

Micção espontânea SVD Uripen

Sistema Locomotor:

Motricidade: Normal Hemiplegia ____ Hemiparesia ____

Paraplegia **Tetraplegia** **Hipotonia** **Atrofia** **Hipotrofia**

Pele

Corada **Hipocorada** **Cianótica** **Eritematosa** **Ictérica** **Hidratada**

Desidratada **Turgor:** Elástico Inelástico **Higiene:** _____

Lesões: Grau _____ **Localização:** _____

Outras observações: (medicamentos, controle hídrico, uso de cateteres, drenos, exames importantes, etc)

Enfermeira: _____ **COREN:26143**

APÊNDICE B -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro(a) Senhor(a)

Eu, IVANY MACHADO DE CARVALHO BAPTISTA, doutoranda do Programa de Odontologia Restauradora, Especialidade Endodontia, da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos / UNESP, portadora do CPF 04049386801, estabelecida à Rua Prof. João Bernardo da Silva, nº 57, na cidade de São José dos Campos-SP, telefone para contato nº (12) 91219597, juntamente com a Professora Márcia Carneiro Valera (Professora Titular de Endodontia da UNESP-SJC, realizaremos uma pesquisa cujo título é;

“Correlação dos Microrganismos da Orofaringe e Fluido Pulmonar em Pacientes sob Ventilação Mecânica Invasiva”

O objetivo dessa pesquisa será detectar os microrganismos que causam infecção na cavidade bucal de pacientes com Intubação Oro Traqueal em Ventilação Mecânica (Respirando com auxílio de Aparelhos) e correlacionar com microrganismos responsáveis por pneumonia (infecção pulmonar) nestes pacientes. Sendo assim, será necessário coletar amostras da cavidade oral, do fluido pulmonar e do sangue. Essas amostras serão transportadas para o Laboratório de Microbiologia, onde serão realizados estudos sobre estes microrganismos e se eles são susceptíveis aos antibióticos empregados.

Os pacientes intubados, em UTI, são submetidos a procedimentos de coleta do fluido pulmonar e exames de sangue, diariamente, sendo assim, o trabalho a ser realizado utilizará o material coletado na rotina diária para análise laboratorial e, a partir desta análise, será possível alterar condutas terapêuticas para resolução clínica do caso. Desta forma, queremos deixar claro que o trabalho não acarretará prejuízo ao paciente, nem ao tempo de internação do mesmo.

Garantimos ainda, em qualquer etapa do estudo, tanto ao paciente, como aos seus responsáveis, o acesso a esclarecimentos de eventuais dúvidas e sobre o andamento do trabalho.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia –UNESP, Av Eng. Francisco Jose Longo, 777, Jardim são Dimas, CEP 12245-000, tel. (12-3947-9000), ou comunique-se com o Dr.Carlos Eduardo da Rocha Santos, médico da Unidade de Terapia Intensiva do Hospital POLICLIN ou com a enfermeira Ivany Machado de Carvalho Baptista cel 12-91219597, que irá realizar esta pesquisa. Informo que será garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado (sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação ou de meu familiar, não implicará em nenhuma despesa), consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.”;

NOME/RESPONSÁVEL _____

RG _____ **CPF** _____

Endereço completo: _____

Assinatura do Responsável/DATA

Assinatura do Pesquisador/DATA

APÊNDICE C - Identificação das espécies bacterianas, de cada espécie, por sítio de coleta e nos diferentes tempos a partir da IOT

Quadro 3 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0.12 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.28 (0) ^{Aa}	0.12 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.24 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.28 (0) ^A	0.28 (0) ^A	0.28 (0) ^A

Quadro 4 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Actinomyces gerencseriae*

<i>Actinomyces gerencseriae</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.43 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{Aa}
Subgingival site	1.1 (1) ^{Ba}	1.12 (1) ^{Aa}	0.57 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.80 (0) ^{ABa}	1.25 (0.5) ^{Aa}	0.86 (1) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.57 (0) ^{AB}	0.57 (0) ^A	0.57 (0) ^A

Quadro 5 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Actinomyces israelii*

<i>Actinomyces israelii</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.64 (0) ^{Aa}	0.88 (0) ^{Aa}	0.85 (1) ^{ABa}
Subgingival site	1.47 (0.5) ^{Aa}	1.12 (1) ^{ABa}	0.42 (0) ^{BCa}
Endotracheal aspirate	1.25 (1) ^{Aa}	2.25 (3) ^{Ba}	2.42 (3) ^{Da}
Endotracheal tube	1.57 (1) ^A	0.57 (0) ^{AB}	0.57 (0) ^{AD}

Quadro 6 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Actinomyces oris*

<i>Actinomyces oris</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.30 (0) ^{Aa}	1.0 (1) ^{Ab}	0.28 (0) ^{Aa}
Subgingival site	1.0 (1) ^{ABa}	0.63 (1) ^{ABa}	0.43 (0) ^{ACa}
Endotracheal aspirate	0.50 (0.5) ^{Ba}	1.63 (2) ^{Ba}	1.57 (1) ^{BCa}
Endotracheal tube	1.0 (1) ^B	1.0 (1) ^{AB}	1.0 (1) ^C

Quadro 7 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Actinomyces odontolyticus*

<i>Actinomyces odontolyticus</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.30 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{ACb}	0.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.70 (1) ^{Ba}	0 (0) ^{ABb}	0.43 (0) ^{Ab}
Endotracheal aspirate	0.40 (0) ^{ABa}	1.0 (0.5) ^{Cb}	1.42 (1) ^{Bb}
Endotracheal tube	0.42 (0) ^{AB}	0.42 (0) ^C	0.42 (0) ^A

Quadro 8 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Tanerella forsythia*

<i>Tanerella forsythia</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.30 (0) ^{Aa}	0.12 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{ABa}
Endotracheal aspirate	0.50 (0) ^{Aa}	0.75 (0.5) ^{Ba}	0.57 (0) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.57 (0) ^A	0.57 (0) ^{AB}	0.57 (0) ^B

Quadro 9 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA
Campylobacter gracilis

<i>Campylobacter gracilis</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.20 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	1.0 (0.5) ^{Ba}	0.50 (0) ^{Aa}	0.72 (0) ^{ABa}
Endotracheal aspirate	0.30 (0) ^{ABa}	1.13 (0.5) ^{Aa}	1.42 (1) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.72 (0) ^{AB}	0.72 (0) ^A	0.72 (0) ^{AB}

Quadro 10 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA
Capnocytophaga gingivalis

<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.10 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.43 (0) ^{ABa}
Subgingival site	0.60 (0.5) ^{Ba}	0.13 (0) ^{Ab}	0 (0) ^{Ab}
Endotracheal aspirate	0.70 (0) ^{Ba}	1.25 (0) ^{Ba}	1.57 (2) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.72 (1) ^B	0.72 (1) ^B	0.72 (1) ^B

Quadro 11 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Capnocytophaga ochracea*

<i>Capnocytophaga ochracea</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.10 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.60 (0.5) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.60 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{ABa}	0.85 (0) ^{ABa}
Endotracheal tube	1.0 (1) ^B	1.0 (1) ^B	1.0 (1) ^B

Quadro 12 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Campylobacter rectus*

<i>Campylobacter rectus</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.20 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.50 (0.5) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.30 (0) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Ba}	0.43 (0) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.28 (0) ^A	0.28 (0) ^{AB}	0.28 (0) ^{AB}

Quadro 13 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Campylobacter showae*

<i>Campylobacter showae</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.30 (0) ^{ABa}	0.13 (0) ^{ABa}	0.28 (0) ^{ACa}
Subgingival site	0.30 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{BCa}	0.85 (1) ^{Bb}
Endotracheal tube	0.71 (0) ^B	0.71 (0) ^C	0.71 (0) ^{BC}

Quadro 14 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Capnocytophaga sputigena*

<i>Capnocytophaga sputigena</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	1.10 (0.5) ^{Ba}	0.25 (0) ^{Aa}	0.86 (0) ^{Ba}
Endotracheal aspirate	0.50 (0) ^{Ba}	1.75 (1.5) ^{Bb}	0.86 (1) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.57 (0) ^{AB}	0.57 (0) ^A	0.57 (0) ^{AB}

Quadro 15 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Eikenella corrodens*

<i>Eikenella corrodens</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.40 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.20 (0.5) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.71 (1) ^{Ba}
Endotracheal aspirate	0.30 (0) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Aa}	0.86 (1) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.86 (0) ^A	0.86 (0) ^A	0.86 (0) ^B

Quadro 16 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Enterococcus faecalis*

<i>Enterococcus faecalis</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.20 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.28 (1) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.20 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.28 (1) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.71 (0) ^B	0.71 (0) ^A	0.71 (0) ^A

Quadro 17 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Eubacterium nodatum*

<i>Eubacterium nodatum</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.60 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	1.42 (1) ^{Ab}
Subgingival site	1.30 (0) ^{Ba}	0.88 (0) ^{ABa}	1.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	1.30 (1) ^{Ba}	2.75 (3) ^{Cb}	2.42 (3) ^{Ab}
Endotracheal tube	1.57 (1) ^B	1.57 (1) ^{BC}	1.57 (1) ^A

Quadro 18 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Eubacterium saburreum*

<i>Eubacterium saburreum</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.20 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{ABa}	0.43 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.80 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Bb}	0.86 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.80 (1) ^{ABa}	1.13 (3) ^{ACa}	1.29 (1) ^{Aa}
Endotracheal tube	1.14 (1) ^B	1.14 (1) ^C	1.14 (1) ^A

Quadro 19 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Fusobacterium nucleatum* spp. *Polymorphum*

<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp. <i>Polymorphum</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.60 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Aa}
Subgingival site	1.0 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Ab}	0.29 (0) ^{Ab}
Endotracheal aspirate	1.40 (1) ^{Aa}	1.63 (1.5) ^{Ba}	1.71 (3) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.86 (0) ^A	0.86 (0) ^{AB}	0.86 (0) ^{AB}

Quadro 20 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Fusobacterium nucleatum* spp. *Vicentii*

<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp. <i>Vicentii</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.10 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.29 (0) ^{Aa}
Subgingival site	1.0 (0) ^{Ba}	0 (0) ^{Ab}	0.71 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.50 (0) ^{ABa}	0.63 (0) ^{ABa}	0.43 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	1.0 (0) ^{AB}	1.0 (0) ^B	1.0 (0) ^A

Quadro 21 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Fusobacterium nucleatum* spp. *Nucleatum*

<i>Fusobacterium nucleatum</i> spp. <i>Nucleatum</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	1.40 (1) ^{Aa}	0.88 (0) ^{ABa}	1.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	1.70 (2) ^{Ba}	0.50 (0) ^{Ab}	0.57 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	1.60 (2) ^{ABa}	2.50 (3.5) ^{ABb}	2.28 (3) ^{Ab}
Endotracheal tube	1.42 (2) ^{AB}	1.42 (2) ^{AB}	1.42 (2) ^{AB}

Quadro 22 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Fusobacterium periodonticum*

<i>Fusobacterium periodonticum</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.40 (0) ^{ABa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.40 (0) ^{ABa}	0.75 (1) ^{Ab}	0.86 (1) ^{Bb}
Endotracheal tube	0.71 (1) ^B	0.71 (1) ^A	0.71 (1) ^B

Quadro 23 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Gemella morbillorum*

<i>Gemella morbillorum</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.60 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.40 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	1.0 (1) ^{Bb}
Endotracheal aspirate	0.60 (0.5) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.86 (1) ^{Ba}
Endotracheal tube	1.0 (0) ^A	1.0 (0) ^A	1.0 (0) ^B

Quadro 24 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Leptotrichia bucallis*

<i>Leptotrichia bucallis</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Ab}
Subgingival site	1.10 (1) ^{Ba}	0 (0) ^{Ab}	0.14 (0) ^{Ab}
Endotracheal aspirate	0.60 (0) ^{Ba}	0.75 (0) ^{Ba}	1.43 (1) ^{Bb}
Endotracheal tube	1.14 (2) ^B	1.14 (2) ^C	1.14 (2) ^B

Quadro 25 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Neisseria mucosa*

<i>Neisseria mucosa</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.60 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.58 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.50 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.58 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.60 (0.5) ^{Aa}	1.25 (1) ^{Bb}	1.71 (2) ^{Bb}
Endotracheal tube	0.71 (0) ^A	0.71 (0) ^{AB}	0.71 (0) ^A

Quadro 26 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Propionibacterium acnes*

<i>Propionibacterium acnes</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.43 (0) ^A	0.43 (0) ^A	0.43 (0) ^B

Quadro 27 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Porphyromonas gingivalis*

<i>Porphyromonas gingivalis</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.20 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Ab}	0.29 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.10 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.29 (0) ^A	0.29 (0) ^A	0.29 (0) ^A

Quadro 28 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Prevotella intermedia*

<i>Prevotella intermedia</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.30 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.20 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Ba}	0 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.14 (0) ^A	0.14 (0) ^{AB}	0.14 (0) ^A

Quadro 29 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Prevotella melaninogenica*

<i>Prevotella melaninogenica</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.10 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{ABa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.40 (0) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.30 (0) ^{Aa}	0.88 (0.5) ^{Ba}	1.0 (1) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.43 (0) ^A	0.43 (0) ^{AB}	0.43 (0) ^B

Quadro 30 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Parvimonas micra*

<i>Parvimonas micra</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.40 (0) ^{Aa}	1.25 (1) ^{Ab}	0.43 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.90 (0.5) ^{ABa}	0.38 (0) ^{Ba}	0.43 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	1.70 (2) ^{Ba}	1.63 (1.5) ^{Aa}	2.0 (3) ^{Ba}
Endotracheal tube	1.30 (2) ^B	1.30 (2) ^A	1.30 (2) ^B

Quadro 31 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA
Prevotella nigrescens

<i>Prevotella nigrescens</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.10 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Ab}	0.29 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.60 (0) ^{Ba}	0.38 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.30 (0) ^{ABa}	1.13 (0.5) ^{Bb}	0.86 (0) ^{Ab}
Endotracheal tube	0.43 (0) ^{AB}	0.43 (0) ^A	0.43 (0) ^A

Quadro 32 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA
Streptococcus anginosus

<i>Streptococcus anginosus</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.30 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Ab}
Subgingival site	0.70 (0.5) ^{Ba}	0.38 (0) ^{Aa}	0.57 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.60 (0) ^{ABa}	0.75 (0) ^{Ba}	0.43 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.57 (0) ^{AB}	0.57 (0) ^{AB}	0.57 (0) ^{AB}

Quadro 33 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Streptococcus gordonii*

<i>Streptococcus gordonii</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.10 (0) ^{Aa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Ab}
Subgingival site	0.10 (0.5) ^{Aa}	0 (0) ^{Ba}	0.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.10 (0) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Ab}	0.57 (0) ^{Ab}
Endotracheal tube	0.43 (0) ^A	0.43 (0) ^A	0.43 (0) ^A

Quadro 34- Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Streptococcus intermedius*

<i>Streptococcus intermedius</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.30 (0) ^{Aa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.29 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.50 (0.5) ^{ABa}	0.13 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.50 (0) ^{ABa}	0.50 (0) ^{ABa}	0.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.86 (1) ^B	0.86 (1) ^B	0.86 (1) ^B

Quadro 35- Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Streptococcus mitis*

<i>Streptococcus mitis</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.80 (0.5) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.60 (0.5) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.30 (0) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.29 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.28 (0) ^A	0.28 (0) ^A	0.28 (0) ^A

Quadro 36- Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Selenomonas noxia*

<i>Selenomonas noxia</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Ab}
Subgingival site	0.10 (0) ^{ABa}	0.25 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}
Endotracheal aspirate	0.30 (0) ^{Ba}	0.50 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.28 (0) ^B	0.28 (0) ^A	0.28 (0) ^A

Quadro 37- Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Streptococcus oralis*

<i>Streptococcus oralis</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.70 (0.5) ^{ABa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.14 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.70 (1) ^{Aa}	0.38 (0) ^{Aa}	0.43 (0) ^{ABa}
Endotracheal aspirate	0.30 (0) ^{Ba}	1.0 (1) ^{Ba}	0.14 (0) ^{Aa}
Endotracheal tube	0.57 (1) ^{AB}	0.57 (1) ^{AB}	0.57 (1) ^B

Quadro 38- Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Streptococcus sanguinis*

<i>Streptococcus sanguinis</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.40 (0) ^{Aa}	0.63 (0) ^{Aa}	0.57 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.60 (0.5) ^{Aa}	0.75 (0.5) ^{Aa}	0.86 (0) ^{Ba}
Endotracheal aspirate	0.80 (0) ^{Aa}	1.13 (1) ^{Aa}	1.14 (1) ^{Ba}
Endotracheal tube	0.86 (1) ^A	0.86 (1) ^A	0.86 (1) ^B

Quadro 39 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Streptococcus constellatus*

<i>Streptococcus constellatus</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0 (0) ^{Aa}	0.13 (0) ^{Aa}	0 (0) ^{Aa}
Subgingival site	0.30 (0) ^{Ba}	0 (0) ^{Ab}	0.14 (0) ^{Ab}
Endotracheal aspirate	0 (0) ^{Aa}	0.38 (1) ^{Bb}	0.28 (0) ^{Bb}
Endotracheal tube	0.71 (0) ^B	0.71 (0) ^B	0.71 (0) ^B

Quadro 40 - Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Treponema denticola*

<i>Treponema denticola</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.60 (0) ^{Aa}	0.75 (0) ^{Aa}	0.28 (0) ^{Aa}
Subgingival site	1.0 (0) ^{ABa}	1.0 (0.5) ^{Aa}	1.14 (0) ^{Ba}
Endotracheal aspirate	0.90 (0) ^{ABa}	2.12 (3) ^{Bb}	2.14 (3) ^{Bb}
Endotracheal tube	1.57 (2) ^B	1.57 (2) ^{AB}	1.57 (2) ^B



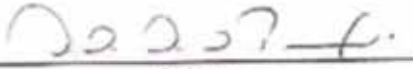
Quadro 41- Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Treponema socransckii*

<i>Treponema socransckii</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	1.1 (0.5) ^{Aa}	1.0 (0) ^{Aa}	2.14 (2) ^{Ab}
Subgingival site	2.1 (3) ^{Ba}	0.88 (0) ^{Ab}	1.71 (2) ^{Bb}
Endotracheal aspirate	2.2 (2.5) ^{Ba}	2.25 (3) ^{Bb}	2.85 (3) ^{Ab}
Endotracheal tube	2 (3) ^B	2 (3) ^B	2 (3) ^{AB}

Quadro 42- Quantificação da carga bacteriana das sondas de DNA *Veillonella parvula*

<i>Veillonella parvula</i>	12 h	48 h	96 h
Oral Mucosa	0.5 (0.5) ^{Aa}	0.88 (1) ^{ABa}	0.71 (1) ^{Ab}
Subgingival site	1.1 (1) ^{Ba}	0.75 (1) ^{ABb}	0.57 (1) ^{Ab}
Endotracheal aspirate	1.2 (1) ^{Ba}	1.63 (1.5) ^{Ab}	2.14 (3) ^{Bb}
Endotracheal tube	0.43 (0) ^A	0.43 (0) ^B	0.43 (0) ^A

ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa

 MINISTÉRIO DA SAÚDE – Conselho Nacional de Saúde – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS	
1. Projeto de Pesquisa: Estudo Clínico: Correlação dos Microorganismos da Orofaringe e Fluido Pulmonar em Pacientes sob Ventilação Mecânica Invasiva.	
2. Número de Sujeitos de Pesquisa: 10	
3. Área Temática:	
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde	
PESQUISADOR RESPONSÁVEL	
5. Nome: Marcia Carneiro Valera	
6. CPF: 039.137.548-22	7. Endereço (Rua, n.º): GELDAHEIS WILSON, 22 PARQUE RESIDENCIAL AQUARIUS SAO JOSE DOS CAMPOS SAO PAULO 13246005
8. Nacionalidade: BRASILEIRA	9. Telefone: (12) 3923 8902
10. Outro Telefone:	11. Email: marcia@foqj.unesp.br
12. Cargo:	
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os recursos e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>	
Data: <u>22, 11, 12</u>	
 Assinatura	
INSTITUIÇÃO PROPONENTE	
13. Nome: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos	14. CNPJ: 48.031.915/0014-40
15. Unidade/Orgão:	
16. Telefone: (12) 3647-9078	17. Outro Telefone:
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumpro os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>	
Responsável: <u>Carlos Augusto Pavanelli</u> CPF: <u>886.795.438/53</u>	
Cargo/Função: <u>Director</u>	
Data: <u>22, 11, 12</u>	
 Assinatura Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli Diretor	
PATROCINADOR PRINCIPAL	
Não se aplica.	


ANEXO B – Carta de Autorização Hospital POLICLIN**Instituto Policlin de Ensino e Pesquisa**


São José dos Campos, 18 de abril de 2013.

A Comissão Científica do Instituto Policlin de Ensino e Pesquisas (IPEP) – Hospital Policlin 9 de Julho, em reunião realizada nesta data, aprovou a realização do Projeto de Pesquisa intitulado **"Estudo Clínico: Correlação dos Microorganismos da Orofaringe e Fluido Pulmonar em Pacientes sob Ventilação Mecânica Invasiva"**, que será desenvolvido pela aluna de Doutorado Ivany Machado de Carvalho Baptista, sob orientação da Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera, nas dependências deste hospital.

A Pesquisa poderá ser iniciada imediatamente após a aprovação pela Comissão de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia – UNESP – SJC.

Sem mais para o momento,


Dr. Carlos Eduardo da Rocha Santos
Diretor Clínico do Hospital Policlin 9 de Julho


Dr. Sylvio José Macedo Becker
Presidente do IPEP


Prof. Dr. João Manoel Theotonio dos Santos
Diretor de Ensino e Pesquisas de IPEP