



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM
CIÊNCIAS DA SAÚDE – PROCISA

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) NA CAVIDADE ORAL DE PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO ESTADO DE RORAIMA

DERLANO BENTES CAPUCHO

BOA VISTA – RORAIMA

2018

DERLANO BENTES CAPUCHO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) DA CAVIDADE ORAL EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA NO ESTADO DE RORAIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciências da Saúde – PROCISA, da Universidade Federal de Roraima – UFRR, para a obtenção do título de Mestre.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Fabiana Granja

CO-ORIENTADORA: Profa. Msc. Márcia Brazão e Silva Brandão

BOA VISTA – RORAIMA

2018

DERLANO BENTES CAPUCHO

CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE RORAIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Ciências da Saúde – PROCISA, da Universidade Federal de Roraima – UFRR, para a obtenção do título de Mestre, defendida em 05 de junho de 2018, e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dra Fabiana Granja
Orientadora- Presidente da banca

Prof. Dr. Mário Maciel de Lima Junior
UFRR

Prof. Dr. Rodrigo Ivo Matoso

**BOAVISTA-RR
2018**

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha esposa, Márcia, por seu apoio incondicional, parceria incomensurável, e constante incentivo durante a caminhada até alcançar este objetivo, sem ela, esse trabalho não seria possível de ser realizado.

Dedico também aos meus filhos, André Samuel e Maria Luiza, que foram excepcionais, ao modo deles, neste período de dedicação ao trabalho.

Dedico também a meus pais, Delciney e Elerina, que acreditaram em mim antes de todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha esposa e coorientadora, Profa. Dra. Márcia Brazão e Silva Brandão pela idealização, direcionamento, perspicácia e confiança durante todo período do trabalho.

Agradeço a Profa. Dra. Fabiana Granja, em ter aceitado o desafio de orientar este trabalho, e pela acolhida e diálogos sempre incentivadores e frutíferos à pesquisa.

Agradeço à equipe do HGR: da DEDIC, Rinilza Felizola Gama, pelo aceite em realizar a pesquisa nas dependências do Hospital Geral; das UTI 1 e 2 que disponibilizaram todos os dados solicitados, bem como, no início, no auxílio as coletas dos pacientes e intermediação com os familiares, em especial ao Mauro Shosuka Asato, pela recepção, ao colega Cirurgião-Dentista e Médico Alexandre Ribas Klippel pelo apoio.

Agradeço a equipe do LACEN: Ao Marconi Aragão Gomes, à Cátia Alexandra Meneses Maito, por me receber na unidade e permitir que o trabalho fosse desenvolvido nas dependências do LACEN/RR; À Bacteriologia, que iniciou o processamento das amostras colhidas e me capacitou a fazer todas as etapas deste.

Agradeço a equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Roraima – LabMol/UFRR que me apoiaram e ajudaram durante a caminhada, aos amigos Rafael Assis, Edimilla Carneiro, Ismael Nascimento, Enayra...., Claudiane Raquel... Miguel...

EPÍGRAFE

“Algo só é impossível até que alguém duvide e prove o contrário”

Albert Einstein.

RESUMO

O cuidado com a higiene oral atualmente é reconhecido fator de prevenção à doenças sistêmicas, pois a microbiota oral é formada por fungos, vírus e aproximadamente de 500 a 700 espécies bacterianas, sendo a maioria associada com a manutenção da saúde bucal do indivíduo de forma comensal. Dentro de 48 horas de admissão para Unidade de Terapia Intensiva (UTI), a contagem total de bactérias viáveis da placa bacteriana oral aumenta e a composição das bactérias da flora normal Gram-positivas sofrem alterações para cepas predominantemente mais virulentas. Estudos têm demonstrado que esta combinação de bactérias e depósitos de componentes salivares podem formar um reservatório de patógenos respiratórios, tais como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* entre outros, que são capazes de provocar pneumonia e abscessos pulmonares em indivíduos inconscientes, internados em unidades de terapia intensiva, sob ventilação mecânica. Esses microrganismos possuem variados mecanismos de defesa para os antibióticos empregados para o seu tratamento, entre eles principal denomina-se beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), que degradam antimicrobianos das classes das penicilinas, cefalosporinas de 1ª a 4ª geração e monobactâmicos. A presença destas espécies bacterianas impede o uso empírico destes antibióticos no tratamento destes pacientes. No intuito de impedir a veiculação de bactérias do biofilme oral para o trato respiratório inferior, é fundamental os cuidados de saúde pelo Cirurgião-Dentista, restabelecendo a higiene oral do paciente internado com a utilização de escovas dentais comuns ou específicas, raspadores de língua, cremes dentais, fio dental e enxaguatórios bucais com substâncias antimicrobianas tais como a clorexidina. O presente estudo tem como objetivo caracterizar fenotípica e genotipicamente os genes relacionados à produção de ESBL em biofilmes orais de pacientes internados na unidade de tratamento intensivo de um hospital público do estado de Roraima, através da análise dos resultados obtidos por método diagnóstico automatizado (VITEK 2 – BioMérieux®) e métodos de biologia molecular, através de PCR convencional dos fragmentos das colônias positivas afim de pesquisar a presença dos genes CTX, TEM e SHV das cepas analisadas e comparar os resultados das cepas encontradas no meio oral dos pacientes, além de avaliar a higiene oral destes, gerando protocolos para minimizar a disseminação de bactérias produtoras de ESBL advindas do meio bucal, utilizando-se dos dados do perfil de resistência para possíveis tratamentos empíricos. Na análise das amostras obtidas 68,97% foram classificadas como Gram-negativas: *K.pneumoniae* (23,75%), *P.aeruginosa* (15%), *A.baumannii* (15%), *E.cloacae* (11,25%). A totalidade dos genes ESBL pesquisados obtiveram identificação positiva. O gene de maior prevalência foi CTX-M, detectado em 85,71% dos achados, o gene TEM correspondeu a 64,28% e SHV em 17,85%. Em associação a maior ocorrência foi CTX-M e TEM, e a associação CTX e SHV não apresentou nenhuma ocorrência. As espécies que mais apresentaram os genes foram *A.baumannii* (17,86%), *P.aeruginosa* (17,86%) *C.koseri* (10,71%), *E.cloacae* (7,14%) e *B.cepacia* (7,14%).

PALAVRAS CHAVE: Higiene oral, resistência bacteriana, pneumonia, UTI.

ABSTRACT

Oral hygiene care is currently recognized as a preventive factor for systemic diseases, since the oral microbiota is composed of fungi, viruses and approximately 500 to 700 bacterial species, most of them associated with maintenance of the oral health of the individual in the commensal way. Within 48 hours of admission to intensive care unit (ICU), the total counts of viable bacteria from oral plaque increases and the composition of Gram-positive normal flora bacteria undergo changes to predominantly more virulent strains. Studies have shown that this combination of bacteria and deposits of salivary components may form a reservoir of respiratory pathogens, such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, among others, which are capable of causing pneumonia and pulmonary abscesses in unconscious individuals hospitalized in intensive care units, under mechanical ventilation. These microorganisms have several defense mechanisms for the antibiotics used for their treatment, among them is called extended spectrum beta-lactamase (ESBL), which degrade antimicrobial classes of penicillins, cephalosporins from 1st to 4th generation and monobactams. The presence of these bacterial species prevents the empirical use of these antibiotics in the treatment of these patients. In order to restrain the transmission of bacteria from the oral biofilm to the lower respiratory tract, health care by Dentist is essential, restoring the oral hygiene of the inpatient with the use of common or specific toothbrushes, tongue scrapers, toothpastes, dental floss and mouthwashes with antimicrobial substances such as chlorhexidine. The present study aims to characterize phenotypic and genotypic genes related to the production of ESBL in oral biofilms of patients hospitalized in the intensive care unit of a public hospital in the state of Roraima, by comparing the result among the classic diagnostic methods such as disk diffusion and antibiogram for ESBL and molecular biology methods through conventional PCR and sequencing of the fragments obtained from the positive colonies in order to investigate the presence of the CTX, TEM and SHV genes of the strains analyzed and to compare the results of the strains found in the mouth of the patients, as well as to evaluate the oral hygiene of these patients, generating protocols to minimize the dissemination of ESBL-producing bacteria from the buccal environment, using resistance profile data for possible empirical treatments. The analysis of the samples obtained 68.97% were classified as Gram-negative: *K.pneumoniae* (23.75%) *P. aeruginosa* (15%), *A.baumannii* (15%), *E.cloacae* (11.25%). All the ESBL genes studied were positively identified. The most prevalent was CTX-M, detected in 85.71% of the findings, the TEM gene corresponded to 64.28% and SHV in 17.85%. In association, the highest occurrence was CTX-M and TEM, and the CTX and SHV association showed no occurrence. The species that presented the higher genes were *A.baumannii* (17.86%), *P.aeruginosa* (17.86%) *C.koseri* (10.71%), *E.cloacae* (7.14%) and *B.cepacia* (7.14%).

KEYWORDS: oral hygiene, bacterial resistance, pneumonia, ICU.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microscopia confocal com laser de varredura de um biofilme com 24 e 72h de evolução ...	22
Figura 2 – Hidrólise do anel Betalactâmico	26
Figura 3 – Árvore filogenética com perfis conhecidos de substratos de betalactâmicos e resistência contra inibidores.....	30
Figura 4 – Distribuição de ESBL em Enterobacteriaceae no Brasil	31
Figura 5 - Unidades de Terapia Intensiva Hospital Geral de Roraima.....	32
Figura 6 - Material para coleta e transporte das amostras até o primeiro processamento (LACEN/RR)	34
Figura 7 -Ágar McConkey para semeadura e seleção de bactérias Gram-negativas.....	35
Figura 8 - Cartela de Identificação de Gram-negativos (GNI) do Sistema Vitek® 2 Compact (BioMérieux®).....	36
Figura 9 - Sistema Vitek® 2 (BioMérieux).....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais classes de antimicrobianos (continua)	24
Tabela 2 – Classificação das enzimas de Beta-lactamases de acordo com o gene e grupo funcional (continua)	27
Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a pesquisa de genes de resistência e seu peso molecular e condições do PCR para sua amplificação	39
Tabela 4 - Identificação fenotípica bacteriana nas coletas de 24 e 72h na UTI do HGR.	44
Tabela 5 -Bactérias produtoras de ESBL, com espécies definidas através da Identificação do Vitek®2 Compact	45
Tabela 6 - Distribuição dos Genes Codificantes de ESBL, isolados e em combinação, por espécie identificada.	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Perfil bacteriano dos pacientes internados em UTI versus advindo dos blocos	41
Gráfico 2 - Evolução bacteriana comparativa entre 24 e 72h por paciente.....	42
Gráfico 3- Evolução bacteriana comparativa entre 24 e 72h por amostra coletada	42
Gráfico 4 - Administração empírica dos antimicrobianos.....	48
Gráfico 5 - Perfil de Sensibilidade aos antimicrobianos (%) testados no painel do Vitek®2 Compact .	49
Gráfico 6 - Perfil de Resistência (%) aos antimicrobianos testados no painel do Vitek®2 Compact.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

HGR: Hospital Geral de Roraima

LACEN/RR: Laboratório Central de Saúde Pública de Roraima

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

ESBL: Beta Lactamase de Espectro Estendido

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

CID-10: Código Internacional de Doenças 10

CIM: Concentração Inibitória Mínima

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	13
2. PROBLEMA	15
3. OBJETIVOS:	17
3.1. GERAL:	17
3.2. ESPECÍFICOS:	17
4. JUSTIFICATIVA	18
5. REFERENCIAL TEÓRICO	19
5.1. A SAÚDE BUCAL E AS PARTICULARIDADES DO PACIENTE INTERNADO	19
5.2. O PAPEL DO CIRURGIÃO-DENTISTA NA UTI.....	20
5.3. OS ANTIMICROBIANOS E OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA....	22
5.3.1. O Biofilme oral	22
5.3.2. Mecanismos de Resistência	23
5.4. A GENÉTICA DA RESISTÊNCIA.....	28
5.5. PANORAMA BRASILEIRO DA RESISTÊNCIA	31
6. METODOLOGIA	32
6.1. AMOSTRA	32
6.2. COLETA DOS DADOS DOS PACIENTES	33
6.3. COLETA DAS AMOSTRAS	33
6.3.1 Biofilme oral.....	33
6.3.2 Identificação fenotípica e antibiograma para pesquisa de ESBL automatizados .	34
6.4. PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA	38
6.4.1 Caracterização molecular das amostras.....	38
6.5. TRATAMENTO DOS DADOS E LEGISLAÇÃO DE REFERÊNCIA	40
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
8. CONCLUSÕES	54
ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	63
APÊNDICE B: Questionário aplicado aos pacientes para coleta de dados biográficos e resultados das amostras dos participantes da pesquisa	66
APÊNDICE C: PROTOCOLO BÁSICO PARA O ATENDIMENTO DO PACIENTE EM AMBIENTE HOSPITALAR E UTI – HGR.....	68

1. APRESENTAÇÃO

O cuidado com a higiene oral é reconhecido fator de prevenção às doenças sistêmicas. A microbiota oral é formada por fungos, vírus e aproximadamente de 500 a 700 espécies bacterianas, a maioria associada com a manutenção da saúde bucal do indivíduo de forma comensal. O conhecimento das alterações anátomo-fisiológicas da cavidade oral dos pacientes é responsabilidade do Cirurgião-Dentista, bem como realizar intervenções efetivas seja do ponto de vista curativo, seja do preventivo e de promoção da saúde global do indivíduo para a manutenção de uma higiene oral satisfatória.

Dentro de 48 horas de admissão para Unidade de Terapia Intensiva (UTI), a contagem total de bactérias viáveis da placa bacteriana oral aumenta e a composição das bactérias da flora normal Gram-positivas sofrem alterações para cepas predominantemente mais virulentas.

Esses microrganismos possuem variados mecanismos de defesa para os antibióticos empregados para o seu tratamento, entre eles destaca-se a produção enzimática de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), que degradam antimicrobianos das classes das penicilinas, cefalosporinas de 1^a a 4^a geração e monobactâmicos. A presença destas espécies bacterianas impede o uso empírico destes antibióticos no tratamento de pacientes hospitalizados.

Os primeiros genótipos relacionados à ESBL foram descobertos através de mutações pontuais das enzimas de amplo espectro TEM (devido ao nome da primeira paciente que o apresentou Temoniera) e SHV (Sulfidril Variável). Os genes TEM e SHV possuem homologia de 68% entre si e foram identificados em todo o mundo com relatos superiores a 100 mutações que ofereciam resistência às cefalosporinas de espectro estendido.

Os genes TEM e SHV, através de sua capacidade de mover-se conjugado a plasmídeos, foram transferidos para espécies patogênicas, ocasionando o surgimento do genótipo CTX – M, no século XXI, sendo as mais prevalentes da atualidade. As bactérias que possuem quaisquer desses três genes de resistência citados já são reconhecidas como um importante causador de infecções hospitalares, e podem ser encontradas colonizando entre 1 e 6% da orofaringe de indivíduos saudáveis, e quando hospitalizados essa proporção triplica. Acredita-se que metade dos indivíduos saudáveis aspira a colonização da orofaringe durante o sono normal e essa proporção aumenta nos pacientes com nível de consciência rebaixado, intubação endotraqueal e/ou nasogástrica e que fazem uso de sedativos, prática recorrente utilizada em Unidades de Terapia Intensiva.

No intuito de diminuir ou eliminar as bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) portadoras de genes de resistência presentes no biofilme oral e impedir o seu carreamento para o trato respiratório inferior, é fundamental a higiene bucal do paciente internado. Os cuidados de saúde bucal incluem higienização assistida por profissional habilitado com a utilização de escovas dentais comuns ou específicas, raspadores de língua, cremes dentais, fio dental e enxaguatórios bucais com substâncias antimicrobianas tais como a clorexidina.

2. PROBLEMA

Nos últimos anos, as bactérias orais têm sido implicadas como importantes agentes patogênicos sistêmicos. Esta hipótese tem sido apoiada particularmente por estudos em pacientes que recebem tratamento em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), que geralmente se apresentam com estado geral de saúde crítico e/ou consciência reduzida durante sua internação, logo, a maioria dos pacientes apresenta uma inadequada resposta imunológica, com redução na quantidade e qualidade de saliva, além da perda da limpeza natural da boca, que é promovida pela mastigação e movimento da língua (PACE, 2007).

Essa situação, em conjunto com o fato de que a higiene bucal nestas condições é frequentemente negligenciada, com conseqüente colonização bacteriana da cavidade oral, em biofilmes abrangendo tanto as superfícies duras quanto os tecidos moles do sistema estomatognático, que devido à sua umidade e temperatura proporcionam um ambiente adequado para o desenvolvimento de comunidades bacterianas complexas, abrigando uma microbiota muito diversificada, com mais de 600 espécies de diferentes graus de virulência (DE MORAES, 2013).

A higiene oral e saúde bucal de pacientes doentes em estados críticos, muitas vezes se deterioram após a hospitalização. Em indivíduos adultos sadios a microbiota oral é composta em maior prevalência de cepas de *Streptococcus viridans*, e após 48-72h de internação em Unidades de Terapia Intensiva. Devido às condições de higiene precárias, pelo estado geral e de consciência do paciente passam a ser aproximadamente 70% de bactérias Gram-negativas, de alta virulência e agressividade e destacam-se as espécies *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* entre outras. Estudos tem demonstrado que esta combinação de bactérias e depósitos de componentes salivares podem formar um reservatório de patógenos respiratórios, tais como *K.pneumoniae* e *P. aeruginosa*, que são capazes de provocar pneumonia, abscessos pulmonares e sepse em indivíduos internados em Unidades de Terapia Intensiva (AMARAL, 2009).

As infecções associadas com bactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido que hidrolisam antimicrobianos, estão relacionadas com número crescente de episódios de surtos e infecções multirresistentes no ambiente hospitalar, elevando as taxas de morbimortalidade além do tempo de internação do paciente, ocasionando efeitos à saúde pública e ao custo do tratamento dos pacientes infectados, sendo necessário seu constante monitoramento. Desde a descoberta destes microrganismos em 1980, se tornaram uma das

principais causas de infecções hospitalares, principalmente na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), com a maioria dos produtores de ESBL sendo isolados a partir de pacientes críticos. Estas degradam os antimicrobianos conhecidos como betalactâmicos, que correspondem a uma classe amplamente empregada no tratamento de infecções graves (RIVA, 2008).

São exemplos destes fármacos as cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima, cefotaxina, cefepima, entre outros), penicilinas e aztreonam, sendo os Carbapenems, fármacos potentes de última geração, a escolha para o tratamento em infecções relacionadas à ESBL. (CARMO et al., 2012).

Com o passar dos anos e o uso progressivo de antimicrobianos betalactâmicos, os genes responsáveis por atribuir esta característica enzimática sofreram seleção de mutações que levaram ao surgimento de diferentes Beta-lactamases, sendo mais comuns as codificadas pelos genes TEM (Temoniera, nome da paciente em que foi identificado pela primeira vez) e SHV (Sulfidril variável, característica química do gene) que possuem grande espectro de atividade, pois induzem resistência a importantes antibióticos de diferentes gerações (OVERDEVEST et al., 2011).

Em relação aos genes de resistência, alta prevalência do gene CTX em *Klebsiella pneumoniae* é identificada na América do Sul, em torno de 45 a 60%, considerando-se um dos mais altos níveis em comparação com as taxas de outros países, onde a cada ano, as taxas diminuem através de organizados programas de monitoramento de resistência. O Brasil não considera os dados de resistência bacteriana passíveis de notificação. (BALI et al., 2010).

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) recomenda que testes de triagem e confirmação sejam realizados rotineiramente para *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* e *Escherichia coli*, consideradas produtoras clássicas da enzima, além de *Proteus mirabilis* (CLSI, 2012). Sendo necessária sua triagem e monitoramento principalmente em Unidades de Terapia Intensiva.

As infecções invasivas associadas à ESBL em UTIs podem estar relacionadas primariamente à colonização em biofilmes, especialmente os orais. Esta colonização é considerada um pré-requisito para a infecção. Para surtos, monitoramento ou fins de pesquisa, esta colonização deve ser investigada, pois indivíduos portadores (colonizados) podem se tornar transmissores ambientais ou de pessoa para pessoa. (BROLUND et al., 2013).

3. OBJETIVOS:

3.1. GERAL:

Caracterizar fenotípica e genotipicamente as bactérias produtoras de Beta-lactamases de espectro estendido em biofilmes orais de pacientes internados nas Unidade de Tratamento Intensivo do Hospital Geral de Roraima.

3.2. ESPECÍFICOS:

- Descrever o perfil epidemiológico dos pacientes presentes no estudo;
- Caracterizar fenotipicamente as cepas coletadas nos biofilmes orais;
- Identificar os perfis de sensibilidade e resistência entre os isolados;
- Pesquisar a presença dos genes CTX, TEM e SHV nos isolados resistentes;
- Relacionar os genes identificados com as espécies onde foram detectados;
- Gerar protocolos para minimizar a disseminação de bactérias produtoras de ESBL advindas do meio bucal, bem como a inserção do Cirurgião-Dentista na equipe multidisciplinar das Unidades de Terapia Intensiva do Hospital Geral de Roraima – HGR.

4. JUSTIFICATIVA

Após 48 horas do início da internação, especialmente em pacientes de unidades de terapia intensiva, a microflora oral sofre alterações. Através de diagnóstico laboratorial, pode-se identificar a colonização por microrganismos patogênicos e multirresistentes. Sendo assim, os cuidados com a saúde oral devem ter sua importância reconhecida pela equipe multiprofissional de saúde, com a manutenção da higiene oral básica, com emprego de escova dental, raspadores de língua e fio dental, além de enxaguatórios antissépticos (clorexidina 0,12%), minimizando a possibilidade de aspiração de bactérias de alta virulência e consequentemente reduzindo o risco de pneumonia e a possibilidade de evolução a sepse nestes pacientes.

No Estado de Roraima, não existem dados acerca do perfil microbiológico das espécies que acometem a microbiota oral dos pacientes nas UTIs. De acordo com Brandão et al., (2014), o número de amostras de secreções traqueais positivas advindas dos internados nas UTIs do Hospital Geral – HGR aumentam a cada dia, com resultados relevantes quanto à resistência microbiana frente aos antibióticos de última geração disponíveis, o que gera hipótese de possível carreamento de microrganismos patogênicos da microbiota oral para o trato respiratório inferior; sendo necessário um estudo das possíveis causas dessas disseminações. O biofilme oral e os cuidados dispensados aos pacientes podem ser considerados importantes fontes de avaliação.

A implementação de um protocolo de cuidados odontológicos frente ao risco do paciente desenvolver pneumonia nosocomial, adquirida dentro da UTI por aspiração dos patógenos da mucosa oral, é de suma importância para a manutenção da saúde destes pacientes, diminuir comorbidades, os custos do tratamento e da manutenção deste paciente em uma Unidade de Terapia Intensiva.

5. REFERENCIAL TEÓRICO

5.1. A SAÚDE BUCAL E AS PARTICULARIDADES DO PACIENTE INTERNADO

A precária saúde bucal é um relevante fator de risco para diversas complicações, inclusive, infecciosas, devido a um desequilíbrio entre o sistema imunológico do indivíduo e a virulência microbiana. A língua saburrosa é uma alteração anatômica relativamente comum formada basicamente por células descamadas, por restos alimentares, fungos, bactérias e enzimas ativas que participam do processo da digestão. Esse biofilme extremamente diversificado de microrganismos precisa ser identificado e removido da cavidade oral através da higiene oral adequada (SEEMANN, 2001).

As bactérias que colonizam a cavidade oral são altamente adaptadas aos vários microambientes abrigados na região da boca e orofaringe, e se fixam através das adesinas especializadas se direcionando para proteínas salivares e epiteliais. Através de seus glicanos desenvolveram a capacidade de formar biofilme e utilizar-se tanto das fontes de nutrientes fornecidas pela dieta quanto das derivadas do hospedeiro, como proteínas e glicanas de superfície. (BENACHINMARDI, 2018)

Algumas bactérias presentes em patologias periodontais, com elevada taxa de virulência, tais como *Staphylococcus aureus* ou *Pseudomonas aeruginosa*, estão frequentemente relacionadas às infecções no trato respiratório inferior do paciente internado em Unidades de Terapia Intensiva. A aspiração direta aos pulmões e modificações do epitélio da mucosa da orofaringe podem atuar como facilitadores na fixação destas bactérias (GOMES-FILHO, 2010).

Como são bactérias frequentemente presentes na região da boca e orofaringe, desempenham importante papel nas infecções mistas com seus mecanismos de defesa e transmissibilidade genética. Causam patogenicidade quando inibem drogas por mecanismos intracelulares, transferem genes plasmidiais e disseminam resistência, além de liberar enzimas no organismo neutralizando os fármacos. (ZIJNGE et al., 2010)

Os pacientes internados em UTI, além de antibioticoterapia de amplo espectro prolongada para tratamento das patologias de base, utilizam-se entre outros fármacos, sedativos, que reduzem a consciência e conseqüentemente a capacidade de limpeza natural da saliva, língua e bochechas durante a fala e mastigação de alimentos fibrosos, acarretando no acúmulo bacteriano (SØRAAS, 2014).

A pneumonia associada à ventilação mecânica - PAVM está relacionada à alta taxa de morbidade, permanência prolongada em UTI e mortalidade em pacientes que receberam ventilação mecânica. O custo do tratamento de infecções em pacientes internados impõe um encarecimento do atendimento, causa aumentos na demanda terapêutica (gastos com antibióticos), permanência hospitalar e da morbimortalidade. (SANTOS,2013)

A colonização do trato aerodigestivo está principalmente envolvida na patogênese da PAVM e representa um motivo importante para a realização de ações de prevenção. Cuidados de higiene bucal, com técnicas de redução mecânica de biofilme oral, além de antissépticos ou antibióticos tópicos, são reconhecidamente eficazes na redução da incidência de PAVM na UTI. (ZJINGE, et al., 2010)

Segundo Santos (2013), o Ministério da Saúde classifica esses custos como: custos diretos (relacionados às despesas do paciente com infecção hospitalar); indiretos (resultantes da morbidade, por exemplo: afastamento, sequelas ou mesmo morte); e os custos intangíveis (impossíveis de serem medidos economicamente, por exemplo: distúrbios provocados pela dor, mal-estar, isolamento, angústia e pelo sofrimento experimentado pelo paciente no ambiente hospitalar). Salienta-se que a admissão do paciente em UTI suscita questão social que envolve todos os familiares próximos ao paciente, gerando impacto também sobre estes que acompanham o doente, durante o curso de sua estada na Unidade de Terapia Intensiva.

Um dos resultados da utilização de antibióticos de amplo espectro tem sido o surgimento de patógenos resistentes a estes antibióticos, um fenômeno que constitui uma ameaça para o sucesso do tratamento de doenças infecciosas, além do surgimento de bactérias multirresistentes (SOUZA, 2012).

5.2. O PAPEL DO CIRURGIÃO-DENTISTA NA UTI

A prevenção da formação e amadurecimento do biofilme oral, além do controle de focos infecciosos é responsabilidade do Cirurgião-Dentista, que enfrenta certa dificuldade em integrar as equipes multidisciplinares em UTI. A saúde bucal do paciente é relevada diante dos problemas críticos apresentados por este, porém, a influência da condição bucal na evolução do quadro dos pacientes internados, é fator chave na morbimortalidade que atinge estes pacientes. (MORAIS, 2010)

BLUM et al., 2017, em pesquisa de influência da odontologia em protocolos de assistência da UTI, descrevem que a ausência de um protocolo de assistência oral adequado e a de programas de treinamento estão correlacionadas com a incapacidade da equipe para resolver problemas de saúde bucal. A presença do Cirurgião-Dentista na rotina da UTI e a implementação de protocolos institucionais com formação adequada do pessoal podem influenciar positivamente as atitudes da equipe multidisciplinar e por consequência no atendimento aos pacientes internados na unidade.

Em seu trabalho, Vidal et al., 2017 compararam pacientes internados em UTI's submetidos a higiene oral (escovação, clorexidina) e nestes houve uma redução da incidência de PAVM e do tempo de permanência na UTI, reduzindo o custo de internação deste tipo de paciente.

Atualmente existem 4 serviços de Odontologia habilitados no HGR: Pronto Atendimento, Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, Oncologia e Odontologia Hospitalar. Esta última, porém, atende aos pacientes internados nas UTIs do hospital de forma esporádica, através de solicitação de pareceres e/ou intervenções pontuais, motivadas pelos profissionais que integram as equipes destas unidades.

Como produto desta dissertação, desenvolveu-se a proposta de um protocolo básico para o atendimento do paciente em ambiente hospitalar, em especial, os internados em UTIs para ser implementado nas dependências do HGR (Apêndice C).

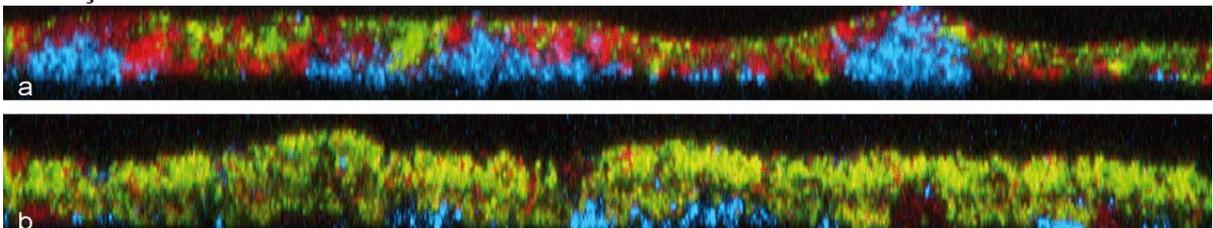
Apesar do conhecimento dos inúmeros benefícios aos pacientes destas unidades, desde 2008 há um projeto de lei federal (nº 2.776/2008) que estabelece a obrigatoriedade da presença de profissionais de odontologia nas Unidades de Terapia Intensiva em tramitação no Senado Federal, e desde então, aguarda apreciação e sanção para tornar-se lei. No estado de Roraima, um projeto de lei foi formatado para ser apresentado na câmara dos deputados pelo Conselho Regional de Odontologia – CRO/RR e aguarda apreciação daquela casa para tramitação, bem como concomitantemente, na Câmara Municipal da cidade de Boa Vista, capital do estado que concentra mais de 63% da população do estado (IBGE, 2010).

5.3. OS ANTIMICROBIANOS E OS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

5.3.1. O biofilme oral

Os biofilmes orais (figura 1) são resultado da agregação bacteriana firmemente unidas a uma superfície utilizando a película de saliva através de adesinas especializadas na superfície celular bacteriana, que reconhecem as proteínas da película via filamentos. Com o amadurecimento desta placa bacteriana, podem refletir uma transição crucial a partir de uma placa sacarolítica predominantemente Gram-positiva para uma placa proteolítica Gram-negativa que pode ser o resultado da disponibilidade de nutrientes (por exemplo açúcares ou proteínas dietéticas de saliva e/ou fluido crevicular gengival) e podem exemplificar várias formas de resistência intrínseca, esta ocorre devido à presença de estruturas ou enzimas bacterianas sem uma exposição prévia a antimicrobianos. O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies pela equipe de prescritores ajuda a escolher as melhores estratégias de tratamento empírico. (LEWIS, 2001; ZJINGE et al., 2010; RICE; BONOMO, 2011)

Figura 1 - Microscopia confocal com laser de varredura de um biofilme com 24 e 72h de evolução



Fonte: ZIJNGE et al., (2010)

Legenda: Corte Sagital de microscopia confocal com laser de varredura de um biofilme oral com 24h (a) e 72h (b) de evolução. Evidenciar a diversidade de espécies bacterianas (a) e a modificação com emergência de bactérias patogênicas (b)

Como são cercados por um revestimento viscoso de DNA, proteínas e polissacarídeos, este constitui uma barreira à penetração por antibióticos, reduzindo sua eficácia, já que cargas elétricas na superfície viscosa impedem a entrada de alguns medicamentos antimicrobianos; a complexa estrutura tridimensional dos biofilmes contém proteínas de transporte para absorção de nutrientes e eliminação de resíduos, que também pode bombear drogas para fora do meio intracelular bacteriano; devido às camadas sobrepostas de células, as mais profundas dentro de um biofilme recebem menos oxigênio e menos nutrientes, logo, crescem lentamente e são, portanto, menos suscetíveis à ação de drogas antimicrobianas. (ROBERTS; MULLANY, 2010)

5.3.2. Mecanismos de resistência

Para compreender os mecanismos de resistência, é importante salientar que Davies; Davies (2010) classificam os antibióticos com base no seu mecanismo de ação, do seguinte modo: Os agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana (penicilinas e cefalosporinas); os agentes que interferem com a permeabilidade da membrana celular do microrganismo (agentes antifúngicos); os agentes que inibem a síntese de proteínas através das subunidades ribossomais 30S ou 50S (tetraciclinas, macrolídeos e clindamicina); os agentes que bloqueiam as etapas metabólicas importantes dos microrganismos (sulfonamidas e trimetoprim); e finalmente, os agentes que interferem com a síntese de ácido nucléico (metronidazol e quinolonas). (CARMO, 2012)

Na Tabela 1 estão evidenciados os principais antimicrobianos, com respectivos mecanismo de ação dos antibióticos e mecanismos bacterianos de resistência.

Tabela 1 – Principais classes de antimicrobianos (continua)

Antimicrobianos	Mecanismo de ação do antibiótico	Mecanismo bacteriano de resistência
Beta-lactâmicos		
Penicilinas	Inibição da parede celular bacteriana através da adesão às Penicilinas ligadoras de Proteínas (PBPs)	Destruição enzimática do anel beta-lactâmico
Cefalosporinas		Modificação do Alvo (PBP)
Carbapenêmicos		Acumulação intracelular reduzida (transporte ativo do ATB)
Glicopeptídeos		
Vancomicina	Inibem os estágios finais de montagem da parede celular, prevenindo as reações de ligação cruzada	Modificação do alvo (PBP)
Teicoplanina		Produção de falsos alvos
Quinolonas		
Fluoroquinolonas		
Norfloxacina	Tem como alvos a <i>DNA</i> girase e topoisomerase IV das bactérias e inibem a etapa necessária de superenrolamento do material genético	Modificação de alvo
Ciprofloxacina		Acumulação intracelular reduzida (transporte ativo do ATB)
Levofloxacina		
Gatifloxacina		
Moxifloxacina		
Aminoglicosídeos		
Gentamicina		
Tobramicina	Tem como alvo a subunidade ribossomal 30s e se ligam à ela para causar leitura errada do código genético que resulta na inibição da síntese de proteínas	Modificação estrutural do ATB
Amicacina		Modificação do alvo
Netilmicina		Redução da absorção do ATB
Paramomicina		
Espectinomicina		

Tabela 1 – Principais classes de antimicrobianos (conclusão)

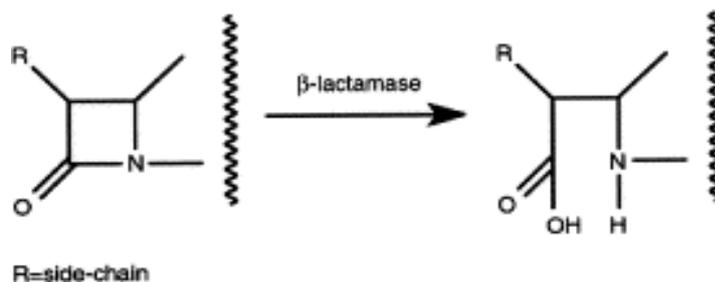
Antimicrobianos	Mecanismo de ação do antibiótico	Mecanismo bacteriano de resistencia
Macrolídeos		
Eritromicina	Tem como alvo a subunidade ribossomal 50s e se ligam à ela para inibir a translocação e o processo de formação da transpeptidase, que resulta na inibição da síntese de proteínas	Redução da absorção intracelular do ATB
Claritromicina		
Azitromicina		Modificação do alvo
Mutilins		
Retapamutilin		
Oxazolidinonas		
Linezolida	Exerce sua atividade por inibição da síntese protéica	Raros relatos de resistência por mutação do gene ribossomal 23S
Polipetídeos		
Colistina (Polimixina E)	Retiram cálcio e magnésio da membrana externa ocasionando dano estrutural e falha na permeabilidade celular levando à morte da célula.	Modificação do alvo
Polimixina B		
Tetraciclina	Tem como alvo a subunidade ribossomal 30s e se ligam à ela para prevenir o acoplamento do RNAt ao RNA do Complexo Ribossomal, inibindo a síntese de proteínas	Acumulação intracelular reduzida (transporte ativo do ATB) Modificação do alvo
Sulfonamidas		
Sulfametoxazol	Tem como alvo as diidropteroato sintetase (DHPS) prevenindo a adição de ácido para-aminobenzóico (PABA), inibindo a síntese de ácido fólico	Modificação do alvo
Cloranfenicol	Tem como alvo a subunidade ribossomal 50s, inibindo a síntese protéica	
Rifamicinas	Interagem com a subunidade beta da RNA-polimerase bacteriana bloqueando a síntese do RNA	Modificação do alvo

Fonte: Adaptado de Davies; Davies (2010).

Estes fármacos agem na inibição da enzima transpeptidase, cuja atividade leva à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura peptidoglicana que confere resistência à parede celular, impedindo a formação integral desta. Os principais mecanismos relacionados à resistência bacteriana que estão relacionados à presença das enzimas beta-lactamases aos antibióticos desta classe (penicilinas, cefalosporinas e monobactams), são a clivagem do anel beta-lactâmico; o mecanismo de alteração de sítio de ação e a bomba de efluxo, que carrea o fármaco para fora da célula bacteriana, tornando-a sem atividade biológica. (MEYER; PICCOLI, 2011; THENMOZHI et al., 2014)

A hidrólise do anel beta-lactâmico central dos antimicrobianos pertencentes a este grupo (Figura 2) ocorre através da enzima hidrolítica beta-lactamase, que ao clivar o anel, confere o primeiro mecanismo de resistência bacteriana aos antimicrobianos beta-lactâmicos. A separação em duas partes leva à formação de um complexo ácido inerte, desprovido de atividade biológica funcional. As bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido também apresentam resistência às outras drogas não beta-lactâmicas (aminoglicosídeos, quinolonas, cloranfenicóis), o que causa um verdadeiro dilema no que diz respeito à terapêutica a ser utilizada em infecções relacionadas às ESBLs (AHMED et al., 2013; MEYER, 2011; RIVA et al., 2008).

Figura 2 – Hidrólise do anel Betalactâmico



Fonte: ZARFEL et al., (2013).

O método original de categorização destas enzimas, baseia-se na Classificação de Ambler, que organiza estas em 4 classes (A, B, C e D) baseado na estrutura molecular (DHILLON, 2011). A maioria das ESBL pertencem à classe A, sendo caracterizada pela adição do aminoácido serina no local ativo da enzima, uma massa molecular de aproximadamente 29.000 Daltons, e a hidrólise preferencial de penicilinas. Esta classe inclui enzimas tais como TEM-1, SHV-1, e a penicilinase encontrada em *S. aureus*.

Atualmente, cerca de 300 genes de ESBL foram descritos, todos codificantes de beta-lactamases dos grupos A e D de Ambler e agrupados em diferentes famílias de genes de ESBL (ZARFEL et al., 2013).

Um outro sistema de classificação foi concebido por Bush e Jacoby (2010), que utiliza as propriedades bioquímicas da enzima mais a estrutura molecular e a sequência de nucleotídeos dos genes relacionados e os classifica em grupos funcionais (Tabela 2).

Tabela 2 – Classificação das enzimas de Beta-lactamases de acordo com o gene e grupo funcional (continua)

Família Enzimática	Grupo ou subgrupo funcional	Número de enzimas	Enzimas representativas
CMY	1, 1e	50	CMY-1 a CMY-50
	2b, 2be, 2br, 2ber	172	
	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2be	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30 (IRT-2), TEM-31 (IRT-1), TEM-163
TEM	2ber	9	TEM-50 (CMT-1), TEM-158 (CMT-9)
	2f	3	SME-1, SME-2, SME-3
SME	2b, 2be, 2br	127	
	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
SHV	2be	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
	2br	5	SHV-10, SHV-72

Tabela 2 – Classificação das enzimas de Beta-lactamases de acordo com o gene e grupo funcional (conclusão)

Família Enzimática	Grupo ou subgrupo funcional	Número de enzimas	Enzimas representativas
CTX-M	2be	90	CTX-M-1, CTX-M-44 (Toho-1) a CTX-M-92
PER	2be	5	PER-1 a PER-5
VEB	2be	7	VEB-1 a VEB-7
GES	2f	15	GES-2 a GES-7 (IBC-1) a GES-15
KPC	2f	9	KPC-2 a KPC-10
OXA	2d, 2de, 2df	158	
	2d	5	OXA-1, OXA-2, OXA-10
	2de	9	OXA-11, OXA-14, OXA-15
	2df	48	OXA-23 (ARI-1), OXA-51, OXA-58
IMP	3	26	IMP-1 a IMP-26
VIM	3	23	VIM-1 a VIM-23
IND	3	8	IND-1, IND-2, IND-2a, IND-3 a IND-7

Fonte: adaptado de Bush; Jacoby (2010)

5.4. A GENÉTICA DA RESISTÊNCIA

Até o início do século XX, a maioria dos relatos da presença de ESBL eram decorrentes das mutações localizadas nos genes das enzimas TEM e SHV e eram descritos como infecções cruzadas em pacientes hospitalares (LEISTNER et al., 2013). Compartilham 68% das

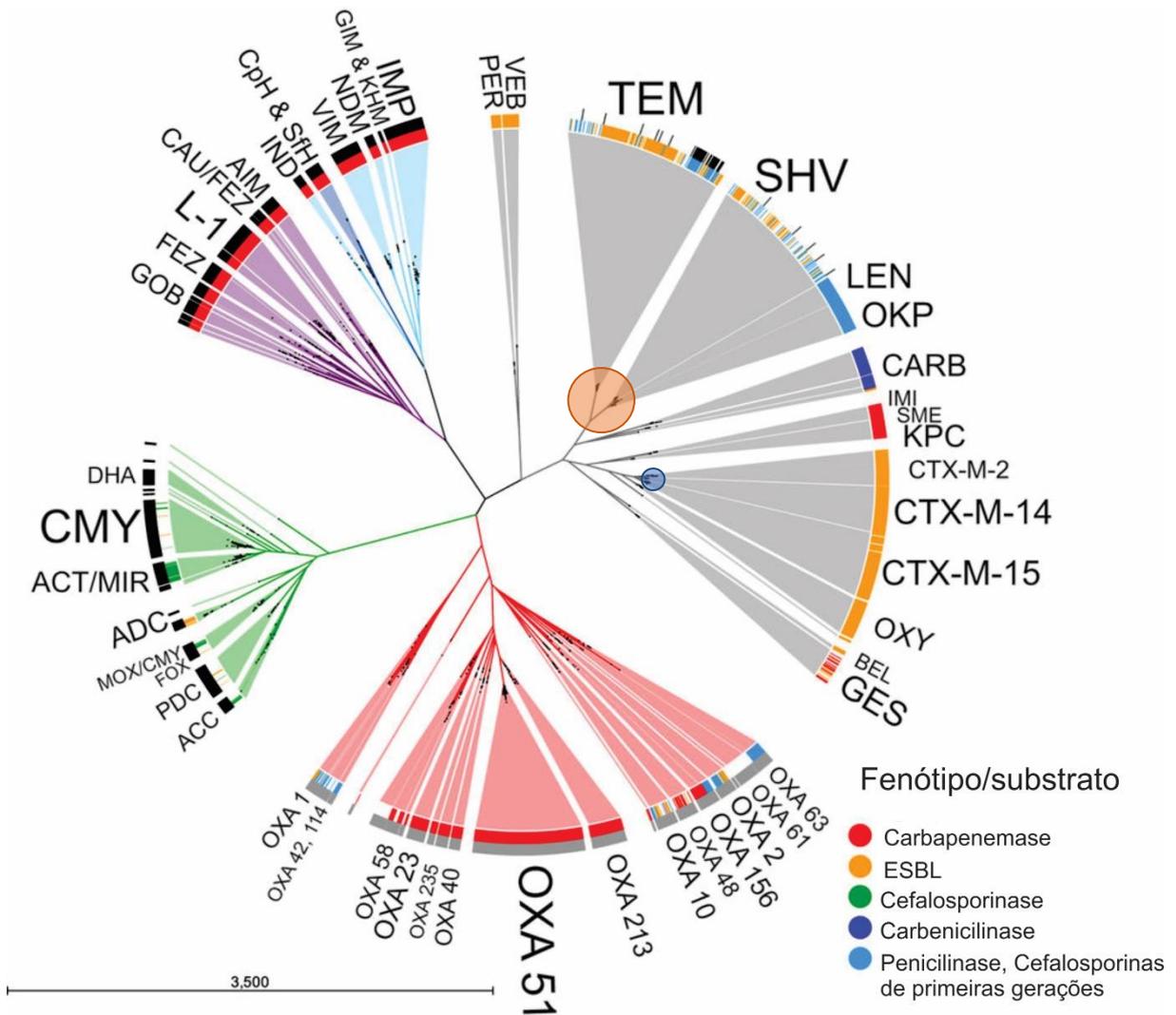
sequências de aminoácidos em homologia, sendo penicilinas e cefalosporinas usualmente encontradas em plasmídeos ou transposons, porém apresentam atividade insignificante contra os antimicrobianos cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona ou aztreonam. (BRADFORD, 2001).

Nos últimos 15 anos, os genes TEM e SHV tem sido substituídos em predominância pelos genes CTX-M e deixaram de ser exclusivamente hospitalares e passaram a ser encontrados também em infecções comunitárias. (LIVERMORE et al., 2012; OVERDEVEST et al., 2011; PATTARACHAI et al., 2008).

As enzimas CTX são caracterizadas pela hidrólise seletiva de cefotaxima em vez de ceftazidima, embora alguns tipos de CTX-M), como o CTX-M-15, podem hidrolisar a ceftazidima. (FOURNIER et al., 2013; PARTRIDGE, S.R, 2015; SILVA et al., 2014).

Descoberta quase que simultaneamente na América do Sul e Europa no ano de 1989, atingiu o ápice sobre outras enzimas no ano 2000. Devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, diversas mutações pontuais foram intensificadas, ocasionando o surgimento de pelo menos cinco genótipos diferenciados entre si pelas suas sequências de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25. (FOURNIER et al., 2013; PARTRIDGE, S.R, 2015). As mais de 130 enzimas CTX, apresentam a identidade de cerca de 40% com as enzimas TEM e SHV (figura 3) e excetuando-se a variante CTX-M-15m geralmente não hidrolisam a ceftazidima (CHAVES et al., 2001) .

Figura 3 – Árvore filogenética com perfis conhecidos de substratos de betalactâmicos e resistência contra inibidores.



Fonte: Adaptado de Brandt, et al., (2017)

Legenda: Os genes SHV e TEM (círculo laranja) compartilham aproximadamente 68% de seu conteúdo genético, já CTX-M (círculo azul) não tem relação direta com estes fenótipos

Muitos dos genes de resistência a antimicrobianos são transportados em plasmídeos, transposons ou integrons (NORMAN et al., 2009). Esta transferência pode ocorrer através de três mecanismos principais: transformação, transdução ou conjugação. A transformação envolve a captação de pequenos fragmentos de *DNA* dispersos e que são incorporados ao *DNA* bacteriano, essas bactérias ficam geneticamente modificadas e são chamadas transformadas. A transdução envolve a transferência do *DNA* de uma bactéria para outra por meio de vírus bacteriófagos. A conjugação envolve a transferência de *DNA* via *pilus* sexual e requer contato célula-célula. Genes que contêm fragmentos de *DNA* de doadores resistentes a antimicrobianos

podem fazer bactérias anteriormente sensíveis a determinados fármacos, expressar resistência codificada por esses genes recém-adquiridos (VAIDYA et al., 2011).

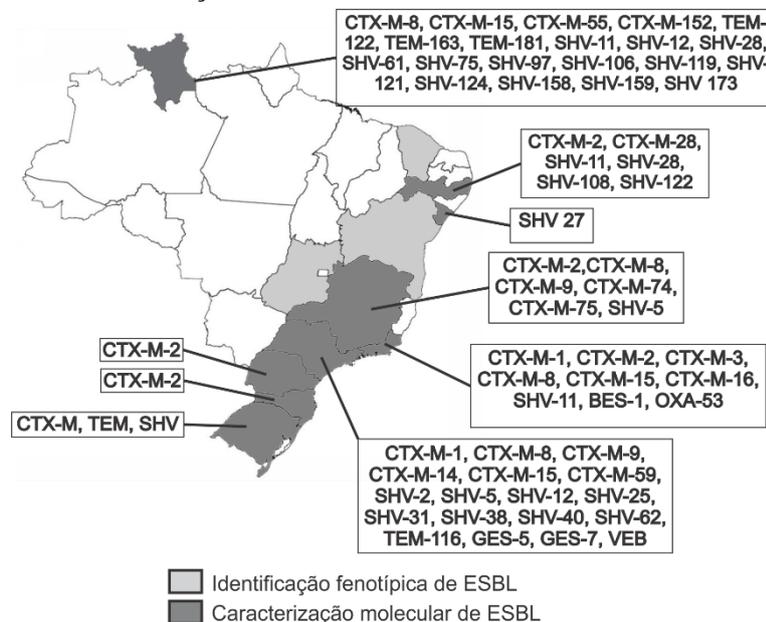
A transferência horizontal do gene, ou o processo de troca de material genético entre cepas, é um mecanismo pelo qual a resistência pode ser adquirida (NORMAN et al., 2009).

5.5. PANORAMA BRASILEIRO DA RESISTÊNCIA

No Brasil, ainda não existem programas de monitoramento relativos à distribuição de ESBL para o controle da resistência antimicrobiana e análise da frequência destas enzimas em cada Estado. O Mapa de resistência à ESBL no Brasil apresenta várias lacunas em diferentes Estados, demonstrando a insuficiência dos dados em várias regiões, principalmente na região Norte (Figura 4).

O diagnóstico clínico de ESBL em Roraima é baseado em resultados liberados por testes fenotípicos, estes são considerados apenas como presuntivos para a presença de ESBL. A identificação dos genes de resistência e os subtipos relacionados são fundamentais para determinar o perfil das beta-lactamases prevalentes no Estado.

Figura 4 – Distribuição de ESBL em Enterobacteriaceae no Brasil



Fonte: Adaptado de SILVA; LINCOPAN, 2012, atualizado com BRANDÃO, 2017

Para o tratamento de infecções relacionadas às bactérias produtoras de ESBL, recomenda-se o uso de antimicrobianos carbapenêmicos. Esta prática gera controvérsias e vários autores descrevem que outros fármacos com eficácia similar também podem ser administrados. Uma prática simples de controle e prevenção a infecção cruzada por estas

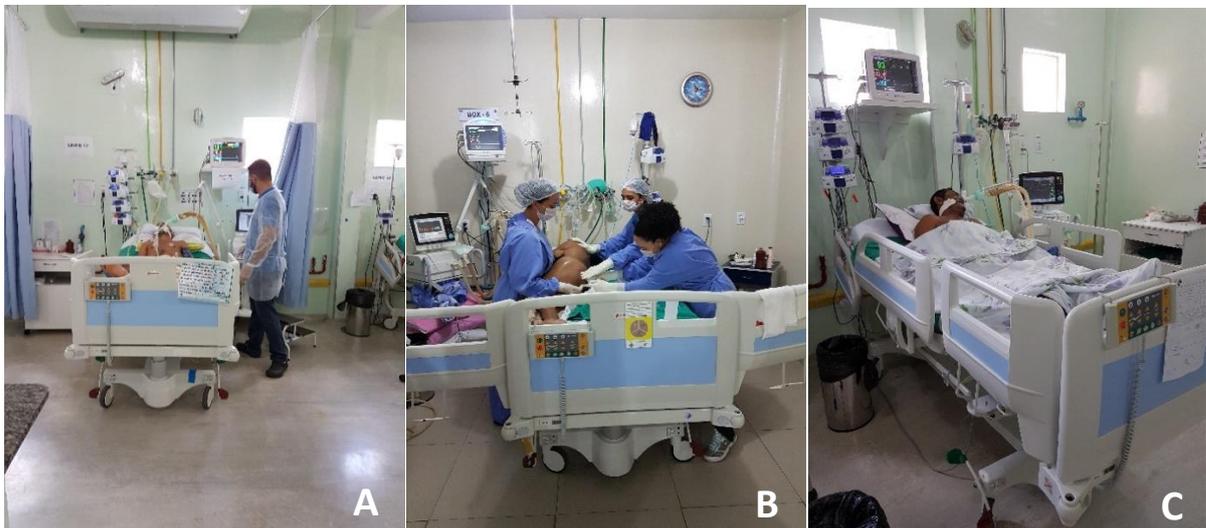
bactérias no ambiente hospitalar seria a adoção efetiva da higiene das mãos antes e após o contato com o paciente. (NORDBERG et al., 2013; CHANDRAMOHAN; REVELL, 2012)

6. METODOLOGIA

6.1. AMOSTRA

Este estudo de coorte é de natureza observacional, prospectivo e experimental. Os dados foram coletados dos prontuários e pacientes internados nas duas UTI's do Hospital Geral de Roraima com capacidade de atendimento de 10 leitos cada uma, e com taxa média de atendimento estimada em 500 pacientes/ano, referência para o atendimento de urgência de média e alta complexidade no estado e retaguarda para o tratamento de elevada complexidade no Sistema Único de Saúde – SUS, os pacientes foram alocados no estudo à medida de sua admissão, diretamente à UTI ou advindas dos *blocos* (terminologia utilizada nesta unidade de saúde, compatível com enfermarias) no período compreendido entre os meses de fevereiro e março de 2017.

Figura 5 - Unidades de Terapia Intensiva do Hospital Geral de Roraima



Legenda: Pacientes em UTI no HGR A) Intubado com profissional iniciando fisioterapia respiratória; B) Assepsia do paciente no leito em paciente com restrição de contato (placa amarela no leito); e C) Paciente após procedimentos de higiene.

Os participantes do estudo (sujeitos da pesquisa) foram pacientes críticos hospitalizados nas UTIs do HGR, independentemente do gênero, etnia, com idade superior a 18 anos com nível de consciência reduzido ou inconscientes, impossibilitados do auto-cuidado, com

respiração mecânica (intubação orotraqueal) e sem comprometimento da abertura bucal. Foram coletadas 116 amostras, de 51 pacientes. Não foram alocados no estudo os pacientes cujos responsáveis não concordaram com sua participação e/ou não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (Apêndice A).

Para verificar se houve alteração do perfil microbiano, o estudo foi realizado em dois momentos, com um intervalo de 72h entre as coletas, e para proteção à confidencialidade, os dados obtidos dos prontuários e questionário, análise laboratorial, diagnósticos e análise do material genético bacteriano além da imagem dos participantes da pesquisa foram utilizados como proposto no projeto de pesquisa proposto para análise no Comitê de Ética em Pesquisa e obtendo a aprovação do registro sob o número 58466116.2.0000.5302 (Anexo 1).

6.2 COLETA DOS DADOS DOS PACIENTES

Através do preenchimento pelo autor da ficha de estudo (Apêndice B) com as informações contidas nos prontuários dos pacientes, as seguintes variáveis foram avaliadas: características sócio-demográficas: idade e sexo; variáveis clínicas como: tempo de permanência na UTI; diagnóstico médico principal (conforme a CID-10), motivo de internação na UTI, co-morbidades, presença de dispositivos invasivos (tubo endotraqueal, cateter venoso central, sonda vesical de demora, gástrica, enteral, drenos), uso de antimicrobianos ou imunossupressores durante a internação e resultados prévio de culturas microbiológicas.

6.3 COLETA DAS AMOSTRAS

6.3.1 Biofilme oral

As coletas de biofilme oral foram realizadas em pacientes das duas UTIs do Hospital Geral de Roraima em duas etapas: a primeira em até 24 horas da admissão do paciente na UTI para identificação das bactérias iniciais à entrada deste. A segunda coleta foi realizada 72 horas após o início do período de internação para a verificação de possível colonização via ambiente hospitalar.

O procedimento da coleta foi realizado somente pelo autor, através do raspado do biofilme lingual com *swab* estéril, maleável e descartável, e incubadas em meio de transporte Stuart Gel sem carvão (Transystem™) com identificação nominal dos pacientes. Todos os kits de coleta são embalados individualmente para impedir qualquer tipo de contaminação.

Os tubos foram enviados ao LACEN/RR – Laboratório Central de Saúde Pública do estado de Roraima, em caixa térmica, e preenchido os dados de identificação do paciente.

Figura 6 - Material para coleta e transporte das amostras até o primeiro processamento (LACEN/RR)



6.3.2 Identificação fenotípica e antibiograma para pesquisa de ESBL automatizados

A cultura bacteriana para a determinação do gênero e espécie e prova de sensibilidade aos antimicrobianos foram desenvolvidas de acordo com o protocolo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2007). Os testes de triagem e confirmação de ESBL seguiram metodologia proposta pelo CLSI no documento M100-S22 (CLSI, 2012) e os procedimentos de identificação e antibiograma foram realizados em colaboração com o LACEN/RR.

Todas as amostras foram semeadas em ágar McConkey, seletivo para o crescimento de espécies Gram-negativas, alvo do estudo, e incubadas por 24h a 37°C em aerobiose. As colônias positivas foram preparadas em uma suspensão bacteriana por meio de diluições em 2,8 ml de solução salina estéril a 4,5%, e então comparadas a escala de McFarland (0,5) com turbidímetro, a qual mede o grau de turbidez da solução, então inoculada em cartelas GNI (*Gram negative identification*) contendo testes bioquímicos fluorescentes, incluindo testes enzimáticos e de

fermentação (FUNKE et al., 1998). Os cartões possuem poços com um substrato de teste individual que medem várias atividades metabólicas, como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibitórias (PINCUS, 2006).

Figura 7 -Ágar McConkey para sementeira e seleção de bactérias Gram-negativas.



Na cartela GNI (Biomeriéux) há possibilidade de identificação de 143 microorganismos, 69 enterobactérias e 74 não-enterobactérias, através de 47 testes bioquímicos e um controle negativo: Ala-Fe-Pro Arilamidase, Adonitol, L-Pirrolidonil-Arilamidase, L-Arabitól, D-Celobiose, Beta-galactosidase, Produção de H₂S, Beta-N-acetil-glucosaminidase, Glutamil Arilamidase pNA, D-Glucose, Gama-glutamil-transferase, Fermentação/glucose, 36 Beta-Glucosidase, D-Maltose, D-Manitol, D-Manose, Beta-Xilosidase, Beta-Alanina arilamidase pNA, L-Prolina Arilamidase, Lipase, Palatinose, Tirosina Arilamidase, Urease, D-Sorbitol, Sacarose, D-Tagatose, D-Trealose, Citrato (Sódio), Malonato, 5- ceto-D-Gluconato, Alcalinização L-Lactato, Alfa-Glucosidase, Alcalinização Succinato, Beta-N-Acetil-Galactosaminidase, Alfa-Galactosidase, Fosfatase, Assimilação Glicina Arilamidase, Ornitina Descarboxilase, Lisina Descarboxilase, Assimilação L-Histidina, Cumarato, Beta-

Glucoronidase, Resistência O/129, Glu-GliArg-Arilamidase, Assimilação L-Malato, ELLMAN e Assimilação L-Lactato (PINCUS, 2006).

Figura 8 - Cartela de Identificação de Gram-negativos (GNI) do Sistema Vitek® 2 Compact (BioMérieux)



Paralelamente ao teste de identificação, o antibiograma foi preparado com um inóculo bacteriano de menor densidade a partir da diluição padronizada utilizada para identificação, em tubo separado deste e inoculado em cartões contendo poços com concentrações específicas de antimicrobianos liofilizados, sendo estes as penicilinas (amoxicilina), penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamase (amoxicilina com clavulanato, sulbactam e tazobactam), cefalosporinas (cefuroxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona e cefepima), carbapenêmicos (ertapenem e imipenem, meropenem), aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), quinolonas (ciprofloxacina), glicilciclinas (tigeciclina) e polimixinas (colistina).

Os tubos são dispostos em um cassete em conjunto com as cartelas de identificação e antibiograma e inseridos no aparelho VITEK®2 Compact, que utiliza uma câmara a vácuo integrada, que aspira o preparado bacteriano para as cartelas e logo em seguida são seladas, e então são incubadas a $35,5 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ sob níveis adequados de oxigenação, mantidos pelo próprio equipamento por até 18 horas.

Figura 9 - Sistema Vitek[®] 2 (BioMérieux)



Os resultados são obtidos por meio de avaliações das atividades metabólicas desses microrganismos em interações com diversos substratos, sendo lido pelo método de turvação e colorimetria através de um sistema ótico utilizando três comprimentos de onda diferentes a cada 15 minutos e então comparados a um extenso banco de dados do VITEK[®].

Esses bancos de dados são constituídos por um grande conjunto de informações provenientes de microrganismos bem caracterizados e testados em várias condições de cultura, ao qual apresentará a CIM (*concentração inibitória mínima*) de cada fármaco, categorizando as cepas de acordo com os resultados de CIM em sensíveis, intermediárias ou resistentes.

As amostras com resultados de identificação fenotípica de Gram-negativos foram selecionadas para análise do antibiograma com perfil de resistência aos antimicrobianos testados, e das cepas resistentes à classe de penicilinas e cefalosporinas (perfil de produtoras de ESBL), foram realizadas alíquotas em microtubos tipo Eppendorf de 1,5 ml e mantidos em *freezer* a -80°C até o momento do processamento.

6.4 PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA

6.4.1 Caracterização molecular das amostras

A extração do *DNA* seguiu metodologia de choque térmico, desenvolvida por Chapman et al., (2001), apresentando algumas modificações propostas por Brandão et al., (2017).

As colônias positivas para produção de ESBL previamente isoladas em ágar McConkey foram inoculadas em 5 ml de caldo Luria à 35°C por 18 horas. Depois de centrifugado a 6.000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 400µl de água ultrapura e aquecido à temperatura de fervura (100°C) por 10 minutos. Os tubos foram imediatamente congelados a -20°C e descongelados posteriormente à necessidade, para o uso na técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% para determinação da quantidade do DNA extraído.

A amplificação de *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaTEM* por PCR foi realizada utilizando-se os iniciadores descritos previamente por Ferreira et al., (2011) e metodologia modificada por Brandão et al., (2017), utilizando-se termociclador *ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems)*. A técnica foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Estudos da Biodiversidade da Universidade Federal de Roraima - LaBMol/CBio/UFRR.

Para reação de PCR os seguintes volumes de reagentes foram utilizados por amostra: 0,5 µl/microtubo dNTPs a 25 µM, 0,5 µl/microtubo dos iniciadores CTX-M-F/TEM-F/SHV-F a 25 µM e 0,5 µl/microtubo do iniciador CTX-M-R/TEM-R/SHV-R a 25 µM, 2,5 µl/microtubo tampão a 10x, 0,75 µl/microtubo cloreto de magnésio (MgCl₂) a 25 µM, 0,5 µl/microtubo *Taq* DNA polimerase (*ThermoScientifics*), 1 µl/microtubo de amostra e água ultra pura livre de nucleases suficiente para 25 µl/microtubo de volume final para a reação. Os oligonucleotídeos iniciadores com seus respectivos pesos moleculares utilizados e a técnica de PCR empregada para a detecção dos genes de resistência estão listados na tabela 3.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a pesquisa de genes de resistência e seu peso molecular e condições do PCR para sua amplificação

Gene	Iniciadores (5'-3')	Condições do PCR	Produto (pb)
<i>Bla</i> CTX-M	F ATGTGCAGYACCAGTAARGT	35 ciclos { 50seg a 94°C; 40seg a 50°C; 1min a 72°C;	593
	R CTGACAGTTACCAATGCTTA		
<i>Bla</i> TEM	F ATGAGTATTCAACATTTCCG	35 ciclos { 1min a 96°C; 1min a 60°C; 1min a 72°C;	867
	R CTGACAGTTACCAATGCTTA		
<i>Bla</i> SHV	F GGTTATGCGTTATATTGCGCC	35 ciclos { 1min a 60°C; 1min a 72°C;	867
	R TTAGCGTTGCCAGTGCTC		

Fonte: Ferreira et al., (2011); Brandão, (2017).

F= Forward (Senso) R= Reverse (Anti-Senso).

Os produtos amplificados foram então submetidos à reação de eletroforese em gel de agarose (SERVA) em concentração de 1,5% do volume do tampão TBE (Tris Borato de EDTA) a 0,5x. Após a total polimerização do gel foram utilizados 5 µl do produto da PCR e homogeneizados com 2 µl de azul de bromofenol a uma concentração de 10% e utilizamos como corante para visualização 10% do total dos volumes (0,7 µl) a ser aplicado no gel do corante fluorescente de alta sensibilidade *Blue Green Loading Dye* (LGC) e posteriormente submetidas ao campo elétrico por 30 minutos a 100 V. Para a análise do tamanho do produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Ludwig Biotecnologia). Após o término da reação, o gel foi visualizado no transiluminador (DNR MiniBis Pro) para a verificação da presença dos produtos de PCR obtidos e fotodocumentação das imagens.

Como controles positivos para análise foram utilizadas cepas previamente identificadas para os 3 genes (*bla*TEM, *bla*SHV *bla*CTX-M) da *American Type Culture Collection* (ATCC).

6.5 TRATAMENTO DOS DADOS

Os resultados obtidos foram submetidos aos testes estatísticos de hipóteses Qui-Quadrado de independência e Risco Relativo utilizando-se o programa BioEstat versão 5.3 (AYRES et. al, 2007). A utilização do presente teste objetiva verificar se as distribuições de duas ou mais amostras não relacionadas diferem significativamente em relação à determinada variável. O nível de significância adotado foi $p < 0.05$ (95% de confiança).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 DADOS BIOGRÁFICOS E EVOLUÇÃO BACTERIANA NAS COLETAS DE 24 e 72 HORAS

Neste estudo, todos os responsáveis legais aos quais foram abordados aceitaram serem alocados, e com 100% de participação, foram obtidas 116 amostras através de 102 coletas, de 51 pacientes internados nas UTIs 1 e 2 do Hospital Geral de Roraima – HGR, no período de fevereiro e março de 2017. Quanto ao gênero dos pacientes, 53% pertenciam ao sexo feminino e 47% ao sexo masculino.

Quanto à localização dos pacientes, 69% estavam na UTI 1 e 31% na UTI 2. Esta diferença em número de pacientes coletados explica-se devido a UTI 1 ter apresentado maior rotatividade de internações no período de coleta.

Analisados os motivos de internação através dos prontuários, verificou-se que os pacientes foram admitidos devido a pós operatórios (35,3%), seguidos de trauma (15,7%), neurológico (13,7%), cardiovascular (7,8%), sepse (5,9%), renal (2%), outros (7,8%), e 11,8% dos pacientes não constavam ao momento das duas coletas com estes dados preenchidos nos prontuários ($n=51$, $\chi^2=29.784$, $p=0.0001$).

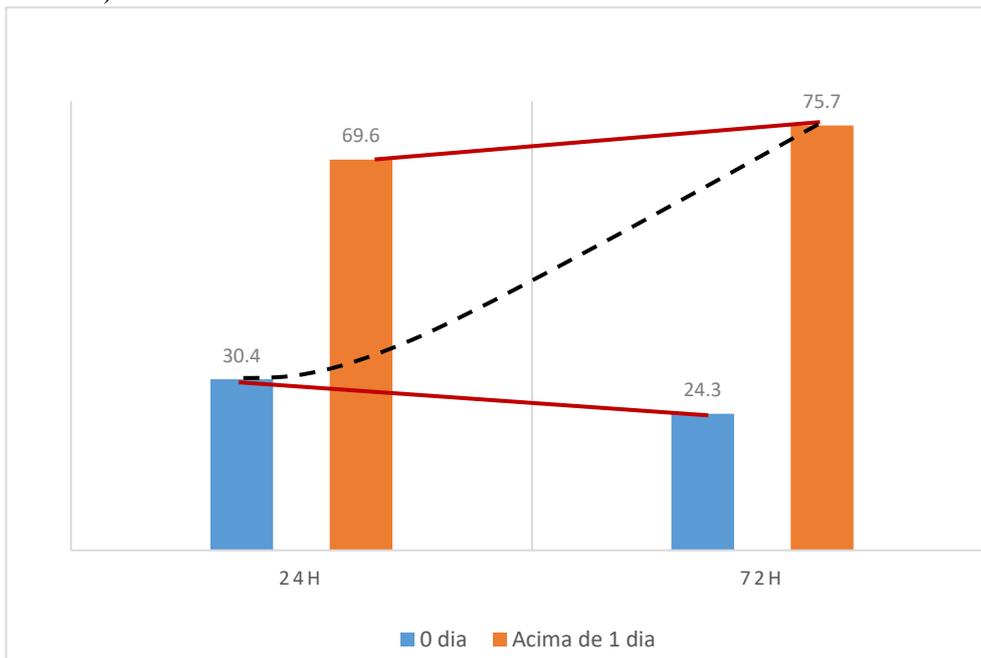
Dos pacientes avaliados, seis (11,75%) vieram a óbito, dois (3,93%) por causas externas (PAF e síndrome HELLP) e quatro (7,85%) por complicações no quadro geral do paciente.

Ao analisar a proveniência dos pacientes, 19,6% destes obtiveram internações diretas na UTI e 80,4% foram provenientes dos blocos (enfermarias). Dados estes que suscitam a hipótese de os pacientes já apresentarem infecções iniciadas em ambiente hospitalar diferente da Unidade de Terapia Intensiva.

A afirmação anterior pode ser percebida através da comparação da frequência bacteriana entre os pacientes internados diretamente na UTI e aqueles provenientes dos blocos (enfermarias). A coleta inicial em 24 horas versus coleta em 72 horas à entrada na UTI demonstrou evolução de 69,6% para 75,7% em pacientes que já apresentavam internação prévia no hospital e redução de 30,4% para 24,3% entre os primariamente na unidade intensiva.

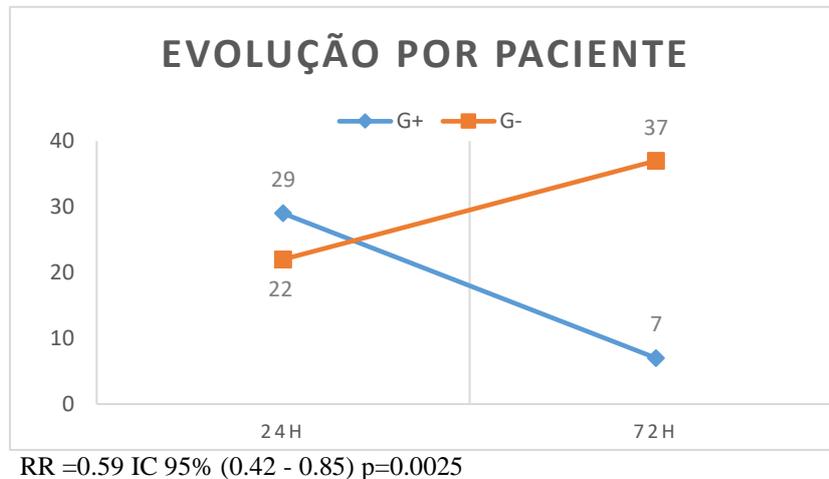
A análise do perfil mínimo encontrado (30,4%) com a maior detecção (75,7%) representa um aumento em mais de 149% no número de espécimes bacterianos entre as coletas de 24 e 72h nestes pacientes, como representado no gráfico 1.

Gráfico 1 - Perfil bacteriano dos pacientes internados em UTI *versus* advindo dos blocos (enfermarias)



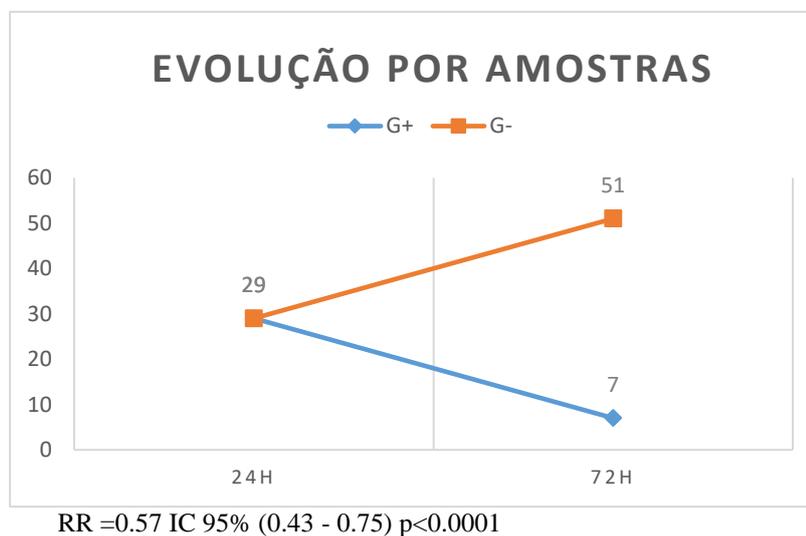
Em relação à detecção de cepas bacterianas e a evolução em 24 e 72 horas: Dos 51 pacientes internados nas UTIs, nas primeiras 24h, 22 (43,13%) apresentavam microrganismos Gram-negativos, e após 72 horas, o número elevou-se para 37 (84,1%), como demonstrado no gráfico 2.

Gráfico 2 - Evolução bacteriana comparativa entre 24 e 72h por paciente



Nesta mesma análise, as amostras coletadas, na primeira coleta (58 amostras), eram espécies Gram-negativas e Gram-positivas na mesma proporção, ambas com 50%. Após 72h ocorreu uma evolução, das 58 amostras coletadas, com 87,9% sendo espécies bacterianas Gram-negativas, como demonstrado no Gráfico 3.

Gráfico 3- Evolução bacteriana comparativa entre 24 e 72h por amostra coletada



A evolução em número dos espécimes identificados no biofilme nos intervalos entre as duas coletas, pode ser evidenciado por Douglas et al., (2014), em pesquisa de revisão sobre as “chaves” de adaptação oral bacteriana. Os autores determinam que a capacidade de utilizar as fontes de nutrientes fornecidas pela dieta quanto as derivadas do hospedeiro, como proteínas e glicanos de superfície proporcionam a multiplicação destas cepas.

A transição em número de microrganismos também é explanada por Garrouste-Orgeas et al., (1997) ao relatar que a colonização bacteriana adquirida durante a internação na UTI (desde a admissão), independentemente do tipo de cepa, possui tempo médio para colonização orofaríngea de 7 dias, e 30 dias para colonização gástrica.

A involução dos espécimes Gram-positivos em 72 horas, observada no gráfico 3 pode ser explicada através da pesquisa de Pereira et al., (2012), ao referir que os colonizadores iniciais do biofilme dental constituem uma parte altamente seletiva da microbiota oral, especialmente *S. sanguis*, *S. oralis* e *S. mitis*, bactérias Gram positivas, que juntas representam 95% do gênero *Streptococcus* e 56% da microbiota inicial total. A sucessão microbiana que segue é uma consequência da alteração que os colonizadores iniciais geram no microambiente, tornando-o suscetível a colonizadores secundários. Os autores complementam que isso pode ser observado em biofilmes após o desenvolvimento de 9 dias. O presente estudo evidenciou esta alteração nas 72 horas entre as coletas.

7.2 ANÁLISE FENOTÍPICA DAS CEPAS

Entre as 116 amostras de cepas isoladas, houve detecção de 36 (31,03%) Gram-positivas, e 80 (68,97%) foram classificadas como Gram-negativas, nas duas UTIs do HGR.

A ocorrência de espécies Gram-positivas na flora normal pode ser evidenciada no conceito de biofilmes orais citados por Zjinge et al., (2010) como sistemas tridimensionais de comunidades bacterianas ligadas às estruturas bucais e modelo para adesão bacteriana, desenvolvimento e resistência aos antibióticos, devido à sua ampla presença e acessibilidade na boca, com a película inicial formada pela saliva e a colonização por microrganismos aeróbios e Gram-positivos em sua maioria.

Benachinmardi et al., (2018) em estudo da microbiota extraída de periodonto de pacientes internados, encontrou 26% de bactérias produtoras de ESBL. Os referidos autores afirmaram a importância do cuidado aos focos infecciosos que possam estar presentes na cavidade oral no momento da entrada ou devido à duração prolongada da internação do paciente em unidade hospitalar.

Na análise total das espécies bacterianas, as espécies mais prevalentes foram: *Klebsiella pneumoniae* (19), seguidas de *Pseudomonas aeruginosa* (12), *Acinetobacter baumannii* (12), *Enterobacter cloacae* (9), *Escherichia coli* (5), outras cepas em menor frequência, como demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Identificação fenotípica bacteriana nas coletas de 24 e 72h na UTI do HGR.

Microorganismo	1a COLETA (ATÉ 24H)		2a COLETA (72H)		TOTAL	
	N	%	N	%	N	%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8	29.63	11	21.15	19	23,75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	18.51	7	13.46	12	15
<i>Acinetobacter baumannii</i>	3	11.11	9	17.31	12	15
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	11.11	6	11.54	9	11,25
<i>Escherichia coli</i>	3	11.11	2	3.85	5	6,25
<i>Burkholderia cepacia</i>	1	3.70	3	5.77	4	5
<i>Citrobacter koseri</i>	1	3.70	2	3.85	3	3,75
<i>Moraxella group</i>	0	0.00	3	5.77	3	3,75
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	3.70	0	0.00	1	1,25
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	3.70	1	1.92	2	2,5
<i>Morganella morganii</i>	0	0.00	2	3.85	2	2,5
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	2	7.41	0	0.00	2	2,5
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	0	0.00	1	1.92	1	1,25
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	3.70	0	0.00	1	1,25
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0.00	1	1.92	1	1,25
<i>Shigella group</i>	0	0.00	1	1.92	1	1,25
<i>Klebsiella oxytoca</i>	0	0.00	1	1.92	1	1,25
<i>Serratia marcescens</i>	0	0.00	1	1.92	1	1,25
TOTAL	29	100	51	100	80	100

$n= 80, \chi^2=27.209, p=0.0003$

O padrão de prevalência se repete quando comparadas a primeira e segunda coletas, com *Klebsiella pneumoniae* (8/11), seguidas de *Pseudomonas aeruginosa* (5/7), *Acinetobacter baumannii* (3/9), *Enterobacter cloacae* (3/6), *Escherichia coli* (3/2).

Padrão equivalente foi encontrado por Nepomuceno et al., (2014) em pesquisa sobre pacientes internados em UTI com intubação endotraqueal, e justificam que a colonização da cavidade oral é um importante fator causador de pneumonia associada a ventilação mecânica, pois em pacientes críticos, a microbiota oral é predominantemente ocupada por microrganismos Gram-negativos.

As cepas de *Klebsiella pneumoniae*, a maior prevalência dentre as identificadas fenotipicamente, estão relacionadas às ocorrências de surtos hospitalares, como os descritos por Lima, et al., (2014) e Haller, S. et al., (2015), que relatam sua ocorrência em unidades de Terapia

Intensiva neonatais no Brasil e na Alemanha, demonstrando a disseminação mundial desta espécie como produtor de ESBL. Lago et al., (2010) em pesquisa de ESBL em um hospital no sul do Brasil, relatam que além de cepas de *E. coli* e *Klebsiella sp*, ocorre em toda a família Enterobacteriaceae a ampla disseminação desse mecanismo de resistência.

Dentre as 80 cepas identificadas, 60 amostras (75%) foram positivas para o perfil produtor de ESBL e passaram à pesquisa dos genes de resistência através da técnica de biologia molecular de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Dentre as espécies com maior frequência destacaram-se *Pseudomonas aeruginosa* (12), *Acinetobacter baumannii*(12), seguidas de *Enterobacter cloacae* (9), *Klebsiella pneumoniae* (6) e outras cepas de menor frequência, como demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 -Bactérias produtoras de ESBL, com espécies definidas através da Identificação do Vitek®2 Compact

Microrganismos	Cepas Identificadas Fenotipicamente	%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	20
<i>Acinetobacter baumannii</i>	12	20
<i>Enterobacter cloacae</i>	9	15
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	10
<i>Burkholderia cepacia</i>	4	6.67
<i>Citrobacter koseri</i>	3	5
<i>Morganella morganii</i>	2	3.33
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2	3.33
<i>Escherichia coli</i>	2	3.33
<i>Shigella group</i>	1	1.67
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	1.67
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	1.67
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	1.67
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	1.67
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1.67
<i>Moraxella group</i>	1	1.67
<i>Serratia marcescens</i>	1	1.67
TOTAL	60	100

$$n= 60, \chi^2=14.80, p=0.0113$$

Interessante ressaltar a modificação da prevalência fenotípica inicial nas cepas de *K. pneumoniae* (tabela 4) entre as bactérias Gram-negativas selecionadas, e frequência destas quando o perfil produtor de ESBL é testado (tabela 5). Inicialmente como a mais frequente, torna-se o quarto lugar em ocorrências, indicando a redução na detecção de 52,6% desta

espécie. Outras espécies, como *P.aeruginosa*, *A.baumannii* e *E.cloacae*, permaneceram com 100% de sua ocorrência inicial e após análise do perfil de bactérias produtoras de ESBL.

Os fatores de virulência em microrganismos que se aderem em biofilme de amostras clínicas, foi explanada por Gharrah, et al., 2017. Os autores relatam a aderência em superfícies é muito significativa nos produtores ESBL em comparação com os não-ESBLs e que as fímbrias, instrumento de adesão microbiana, são os fatores de virulência responsáveis pela adesão de *K. pneumoniae*, aumentando sua capacidade de crescer na comunidade de biofilme.

A detecção de cepas não pertencentes à família das enterobactérias, como as frequências de *Pseudomonas aeruginosa*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bhurkoldeira cepacia*, *Moraxella spp* e *Acinetobacter spp* (38,9%) apresenta cepas não-enterobactérias, como os Bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose (BGN), sendo a causa comum de infecções nosocomiais.

Os principais patógenos oportunistas deste grupo compreendem: *A.baumannii*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *S. paucimobilis* e *S. maltophilia*. Estes microrganismos aproveitam as condições e doenças subjacentes para causar infecção e emergir como patógenos oportunistas, apesar de *S. paucimobilis* não ser relatado entre os principais causadores de infecções nosocomiais, é importante a investigação não só deste como todos os patógenos pela equipe da Comissão e Controle de Infecções Hospitalares - CCIH para conhecimento do percentil e papel de cada bactéria envolvida e/ou detectada em infecções nosocomiais, como afirmado por Ryan e Adley (2010).

Badave e Kulkarni (2015), em seu estudo afirmam a correlação entre a espécie de *A.baumannii* e a multirresistência a antimicrobianos por infecção de sítios diversos em ambiente hospitalar é possível causa de infecção cruzada devido a características de sobrevivência em superfícies e/ou ambientes hostis por longo período. Os autores explanam na mesma pesquisa que cepas de *Acinetobacter* aderem-se à biofilmes e possuem excepcional resistência antibiótica.

Entre os isolados, 20% foram identificadas como cepas de *P. aeruginosa*. Possíveis medidas de redução deste patógeno no ambiente hospitalar, foram sugeridas pelos estudos realizados por Galetti (2014), que detectou 5,46% de frequência desta espécie em UTI. O autor relata, que nas unidades testadas em seu estudo, ocorreu efetivo controle e utilização racional dos antimicrobianos, mediante iniciativa da comissão de controle de infecção hospitalar – CCIH.

Apesar de baixa, a ocorrência de *B. cepacia* em 6,67% dos pacientes deste estudo, este dado possui relevância, como proposto por Tseng et al., (2017) que caracterizam a mesma como

um microrganismo de difícil tratamento por sua resistência intrínseca a diversos antimicrobianos e desinfetantes, além de encontrar em 94,4% dos espécimes estudados diversas mutações específicas no gene regulador da bomba de efluxo, importante mecanismo de resistência bacteriana.

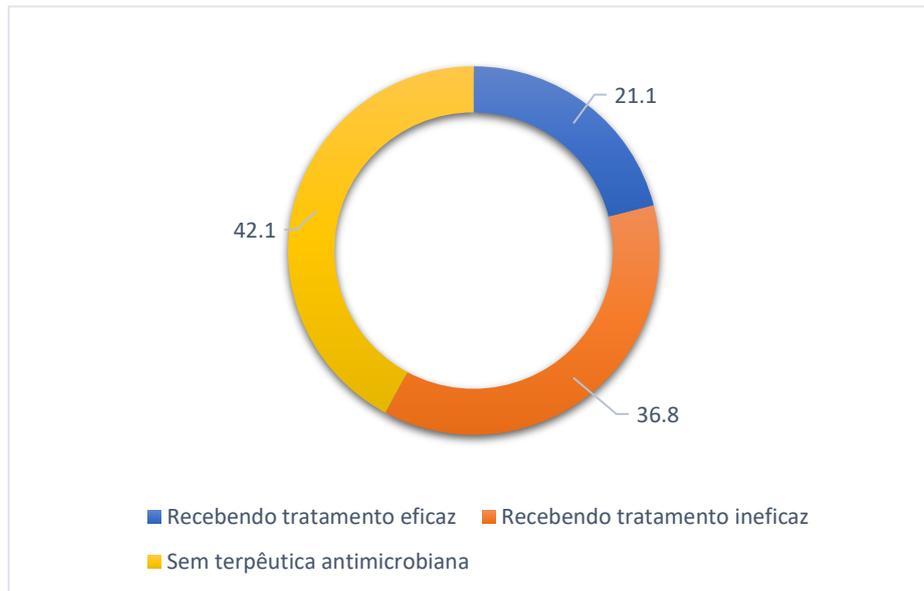
A frequência diminuída de *B. cepacia* pode ser explicada devido à esta ser caracterizada como uma *Pseudomonas* até meados de 1992, ocorrendo a errônea interpretação técnica de considerar estas cepas no lugar de *Burkholderia*, que é conhecido patógeno causador de “síndrome cepácia” - Quadro séptico em pacientes com fibrose cística e doença granulomatosa crônica pulmonar com evolução de bacteremia e óbito (FEHLBERG et al., 2013; TSENG et al., 2017).

Como trata-se de uma espécie pertencente a um complexo de 17 bactérias Gram-negativas não fermentadoras da glicose encontrada amplamente no meio ambiente, Marconatto et al., (2017) em seu estudo a correlacionou como fitopatógeno com 47% de ocorrência média em apodrecimento de escamas de cebolas armazenadas para venda na entressafra no vale do Itajaí/SC.

7.3 TERAPÊUTICA ANTIMICROBIANA EMPÍRICA EM UTI

Quando analisados os fármacos prescritos nos dados dos prontuários médicos, verificou-se que a maioria dos pacientes (42,1%) não estavam submetidos à terapêutica antimicrobiana, ou realizavam terapêutica incorreta (não condizente com perfil de suscetibilidade do microrganismo posteriormente detectado) (36,8%). Somente em 21,2% dos pacientes os antimicrobianos administrados eram os indicados no painel de sensibilidade disponibilizado pelo Vitek® (Gráfico 4)

Gráfico 4 - Administração empírica dos antimicrobianos



A terapêutica antimicrobiana empírica é recomendada como um tratamento prescrito baseado no quadro de sinais e sintomas sugestivos de infecção bacteriana no paciente, onde não há identificação prévia do agente etiológico causador da infecção (RAMAN et al., 2015).

A antibioticoterapia empírica da pneumonia adquirida no hospital é predominantemente com base em uma análise de tempo (maior ou menor que 5 dias) entre o início da admissão nas enfermarias do hospital ou na UTI. Baseia-se em observações de substituição da flora nasofaríngea por bactérias Gram-negativas resistentes intrinsecamente, que podem ter acesso ao trato respiratório inferior durante a hospitalização (SOMMERSTEIN, et al., 2018)

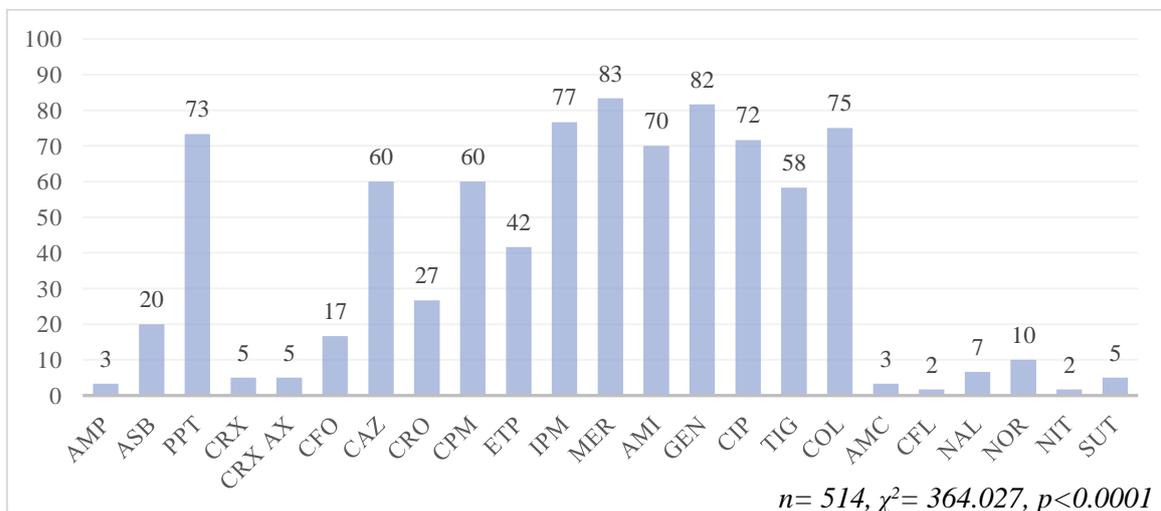
Esta modalidade terapêutica é necessária devido ao quadro grave em que o paciente apresenta, e não há como aguardar o tempo necessário a liberação dos exames de identificação (acima de 48h), este por outro lado possui índice de falha elevados, como evidenciados em nosso estudo (36,8%), pois muitas vezes a resistência potencial do microrganismo não é considerada na seleção de medicamentos iniciais para a terapêutica empírica, esta terapêutica deve ser revista assim que os dados diagnósticos do paciente forem obtidos, optando-se pela substituição ou associação de fármacos (BOYD; NAILOR, 2011).

A partir dos resultados apresentados de discordância no tratamento empírico e crescimento microbiano, pode-se evidenciar como uma das causas da resistência a administração empírica inapropriada de antimicrobianos e/ou a sua não administração no ambiente hospitalar em questão.

7.4 SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A análise do teste de sensibilidade a antimicrobianos revelou os fármacos Piperacilina associado ao Tazobactam, Ceftazidima, Cefepime, Imipenem, Meropenem Amicacina Gentamicina, Ciprofloxacina, Tigecilina e Colistina como mais sensíveis para as bactérias produtoras de ESBL, o perfil completo de sensibilidade está apresentado no Gráfico 5.

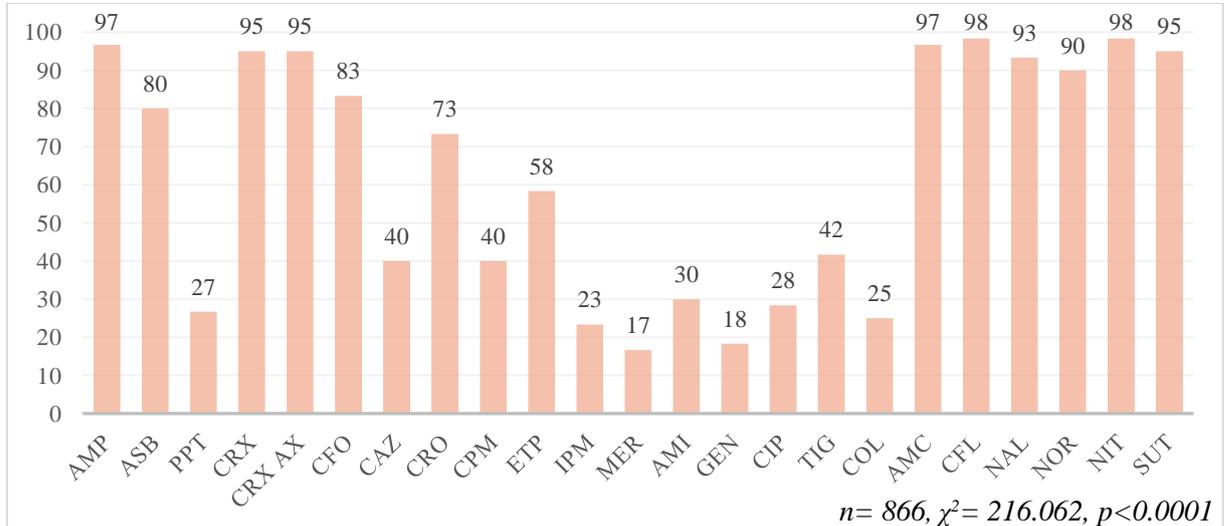
Gráfico 5 - Perfil de Sensibilidade aos antimicrobianos (%) testados no painel do Vitek®2 Compact



Legenda: **AMP**: Ampicilina; **ASB**: Amoxicilina + Sulbactam; **PPT**: Piperacilina + tazobactam; **CRX**: Cefuroxima; **CRX AX**: Cefuroxima Axetil(oral); **CFO**: Cefoxitina **CAZ**: Ceftazidima **CRO**: Ceftriaxona; **CPM**: Cefepime; **ETP**: Ertapenem; **IPM**: Imipenem; **MER**: Meropenem **AMI**: Amicacina; **GEN**: Gentamicina; **CIP**: Ciprofloxacina; **TIG**: Tigecilina; **COL**: Colistina; **AMC**: Amoxicilina + Clavulanato; **CFL**: Cefalotina; **NAL**: Ácido Nalidíxo; **NOR**: Norfloxacina **NIT**: Nitrofurantoína; **SUT**: Trimetopima + Sulfametoxazol

Em relação ao perfil de resistência, os antimicrobianos da classe das cefalosporinas apresentaram índices acima de 90%, o que corresponde ao comportamento hidrolítico da enzima para esta classe de fármacos. A mesma faixa de frequência foi encontrada para ampicilina, amoxicilina com sulbactam, amoxicilina com clavulanato, cloranfenicol, ácido nalidixico, norfloxacina, nitrofurantoína e sulfatrimetopima. Os fármacos e os seus respectivos valores de resistência encontram-se listados no Gráfico 6

Gráfico 6 - Perfil de Resistência (%) aos antimicrobianos testados no painel do Vitek®2 Compact



Legenda: **AMP**: Ampicilina; **ASB**: Amoxicilina + Sulbactam; **PPT**: Piperacilina + tazobactam; **CRX**: Cefuroxima; **CRX AX**: Cefuroxima Axetil(oral); **CFO**: Cefoxitina **CAZ**: Ceftazidima **CRO**: Ceftriaxona; **CPM**: Cefepime; **ETP**: Ertapenem; **IPM**: Imipenem; **MER**: Meropenem **AMI**: Amicacina; **GEN**: Gentamicina; **CIP**: Ciprofloxacina; **TIG**: Tigecilina; **COL**: Colistina; **AMC**: Amoxicilina + Clavulanato; **CFL**: Cefalotina; **NAL**: Ácido Nalidíxo; **NOR**: Norfloxacin **NIT**: Nitrofurantoína; **SUT**: Trimetopima + Sulfametoxazol

Os antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos, perfil de sensibilidade mais frequente nesta pesquisa, são considerados por diversos autores, como tratamento mais confiável para infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL e que a emergência da resistência à esta classe, é fator de preocupação (SALVATORE; RESMAN-TARGOFF, 2015). O baixo índice de resistência aos carbapenêmicos detectado neste estudo (média de 24,6%), reforça a adoção desta classe de antimicrobiano como primeira escolha no tratamento dos pacientes internados em UTIs

A Colistina, assim como os carbapenêmicos, é considerada terapia de escolha em infecções por bactérias multirresistentes, no entanto, Pogue et al., 2015 cita que os isolados bacterianos tem apresentado Pan-resistência, que é definida como a hidrólise dos antimicrobianos de todas as classes disponíveis (BASAK et al., 2016).

O perfil de sensibilidade para o fármaco piperacilina associada a tazobactam - PPT (66,7%), que é uma associação de antimicrobianos da classe das penicilinas e um inibidor de betalactamase (tazobactam) indica este antimicrobiano como tratamento para os pacientes internados. Ng et al., (2016) em pesquisa de tratamento empírico com PPT, detalha que os

indivíduos que receberam a administração deste, em um período de 30 dias, tiveram menores índices de infecções fúngicas e bacterianas. Apesar do conhecimento estabelecido acerca deste, nenhum dos pacientes durante o período analisado, estava utilizando este fármaco durante esta pesquisa.

Antimicrobianos são utilizados em associação para o tratamento de infecções por ESBL. Como o desenvolvimento de um novo antimicrobiano: Ceftolozano. Cefalosporina de quarta geração que associada ao tazobactam, apresenta 86% de suscetibilidade às pseudomonas e que obteve registro aprovado pelo FDA em 2014 (Registrado na ANVISA em janeiro de 2018), sob o nome de ZERBAXA[®], produzido pela Merck[®] (SADER et al., 2014.).

Em estudo recente, D'Angelo et al., (2016) afirmam que a terapêutica utilizando o fármaco cefepime, também cefalosporina de quarta geração, é a alternativa mais recomendada em associação com carbapenêmicos, apresentando boa eficácia de tratamento. Em nosso estudo este fármaco apresentou percentual mediano de sensibilidade (66,7%).

Os antimicrobianos da classe das penicilinas apresentaram índices próximos de 100% de resistência. A mesma faixa de frequência (80 a 97%) foi encontrada para cloranfenicol, ácido nalidixico, norfloxacin, nitrofurantoína e sulfatrimetropima.

Fortaleza et al., (2017) afirmam que devido a prevalência dos microrganismos causadores de infecções multirresistentes e as altas taxas de resistência aos antimicrobianos, estas infecções relacionadas a assistência à saúde, principalmente em pacientes hospitalizados em UTIs deve ser uma prioridade de saúde pública nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, em toda sua singularidade e extensão geográfica.

7.5 ANÁLISE MOLECULAR DAS AMOSTRAS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS PRODUTORAS DE ESBL

Todos os genes de ESBL propostos nos objetivos deste trabalho obtiveram identificação positiva (Tabela 6). A amplificação por PCR evidenciou a presença destes em isolado e em combinação nas cepas caracterizadas fenotipicamente como produtoras de beta-lactamases. O gene de maior prevalência foi CTX-M, detectado em 14 espécies, representando 85,71% dos achados, o gene TEM correspondeu a 64,28% e o gene SHV em 17,85% (Tabela 6).

Jalilian, et al., 2017 ao avaliar a presença de *Escherichia coli* em biofilmes, detectaram que em 68,3% das amostras analisadas em seu estudo apresentaram o gene CTX e 46,6% o gene TEM, enquanto nenhuma amostra contendo o gene SHV foi detectado. Os autores fundamentam que a capacidade de formar biofilmes desempenha um papel fundamental na

virulência dessas bactérias e que os isolados com a capacidade de formar biofilmes devem ser rapidamente detectados para auxiliar em apropriadas decisões terapêuticas.

Tabela 6 - Distribuição dos Genes Codificantes de ESBL, isolados e em combinação, por espécie identificada.

<i>Microrganismo</i>	<i>N</i>	<i>%</i>	<i>Genes</i>							
			<i>CTX-M</i>	<i>TEM</i>	<i>SHV</i>	<i>CTX-M + TEM</i>	<i>TEM + SHV</i>	<i>CTX-M + SHV</i>	<i>CTX-M + TEM + SHV</i>	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	5	17.86	1		2	1				1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	17.86	2	2		1				
<i>Citrobacter koseri</i>	3	10.71	1	1				1		
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	10.71	1	2						
<i>Escherichia coli</i>	2	7.14	1	1						
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	7.14	2							
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	3.57	1							
<i>Serratia marcescens</i>	1	3.57	1							
<i>Shigella group</i>	1	3.57								1
<i>Sphingomonas paucimobilis</i>	1	3.57		1						
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	3.57		1						
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	3.57				1				
<i>Serratia liquefaciens</i>	1	3.57	1							
<i>Morganella morganii</i>	1	3.57	1							
TOTAL	28	100	12	8	2	3	1	0		2

A análise individual em um paciente nesta pesquisa, em que não havia prescrição de terapêutica antimicrobiana, apenas utilização de corticóide (dexametasona), mostrou uma evolução nos genes de resistência. Na primeira coleta foi detectada a espécie *K.pneumoniae spp* com um gene de resistência (CTX-M), após 72h, ocorreu o surgimento de *A.baumannii* com três genes de resistência. Da Silva et al., (2017), em pesquisa avaliativa da incidência de PAVM em 190 pacientes de Unidade de Terapia Intensiva estabelecem íntima relação entre os microrganismos, ao exercer importante papel em infecções multirresistentes em pacientes imunossuprimidos em UTIs.

A imunossupressão e sua relação com cepas produtoras de ESBL também foram compreendidas por Laheij et al.,(2012) ao citar que cepas de *Pseudomonas spp.* podem representar um importante perigo para a saúde, particularmente para pacientes imuno comprometidos. Por estar associada a vários tipos de infecção, incluindo a pneumonia adquirida

no hospital. Em nosso estudo, a espécie *Pseudomonas aeruginosa* apresentou a segunda maior frequência para os genes de ESBL.

A frequência de CTX identificada como mais prevalente nesta pesquisa, torna-se fator de grande relevância por serem consideradas como maior grupo de enzimas ESBL adquiridas na comunidade e em infecções nosocomiais em vários países ao redor do mundo (HAZIROLAN, et al., 2018).

Na avaliação de determinantes de resistência a antibióticos em biofilmes orais, Kim et al., (2011), identificaram o gene TEM presente em todas as amostras de sua pesquisa e o SHV apresentou zero detecção. Os autores evidenciam que os fatores de resistência são mais diversificados e abundantes em pacientes com periodontite do que em indivíduos saudáveis, sugerindo que há uma diferença na distribuição de resistência antibiótica em biofilmes orais associados à saúde e doença.

Através da análise dos referidos autores, pode-se sugerir que os pacientes pertencentes à esta pesquisa, podem ter carreado infecções bacterianas anteriores à internação na UTI, com periontopatias ou infecções odontogênicas.

Esta afirmação é reforçada pelos estudos realizados por Rôças e Siqueira, 2013 na detecção de genes de resistência a antibióticos em amostras de infecções endodônticas agudas e crônicas. Os resultados destes autores apresentaram todos os abscessos positivos para bactérias produtoras de ESBL. A maior prevalência foi para os genes TEM (24% das detecções). O artigo cita este gene como amplamente distribuído entre as amostras de biofilme periodontal, independentemente do estado da doença.

A higiene bucal insuficiente, a possibilidade de periodontopatias no paciente de UTI ou patologias prévias à internação, constituem-se fatores de favorecimento de infecções por cepas multirresistentes, que apresentam genes capazes de produzir enzimas que hidrolisam diversas ou todas as classes de antimicrobianos, como comprovado nesta pesquisa.

O biofilme bucal em pacientes da UTI abriga cepas com resistência intrínseca e este sendo aspirado, pode ser provável causa das pneumonias nosocomiais. A atuação do Cirurgião-Dentista, como fator de prevenção, diagnóstico, manutenção da higiene oral e tratamento dos focos infecciosos para obtenção da saúde bucal, em integração com a equipe de saúde, é fundamental na promoção da saúde do paciente.

8. CONCLUSÕES

Com este estudo, foi possível concluir que quanto ao gênero dos pacientes, 53% pertenciam ao sexo feminino e 47% ao sexo masculino, seis (11,75%) vieram a óbito. Quanto à localização dos pacientes, 69% estavam na UTI 1 sendo admitida nas duas UTIs devido a pós-operatórios (35,3%), Quanto à origem, 80,4% foram provenientes dos blocos (enfermarias).

Entre as 116 amostras de cepas, houve 68,97% classificadas como Gram-negativas e espécies mais prevalentes foram: *Klebsiella pneumoniae* (23,75%), seguidas de *Pseudomonas aeruginosa* (15%), *Acinetobacter baumannii* (15%), *Enterobacter cloacae* (11,25%).

Dentre as 80 cepas identificadas, 60 amostras (75%) foram positivas para o perfil produtor de ESBL. As espécies com maior frequência destacaram-se *Pseudomonas aeruginosa* (20%), *Acinetobacter baumannii*(20%), seguidas de *Enterobacter cloacae* (15%), *Klebsiella pneumoniae* (10%) .

A análise do teste de sensibilidade a antimicrobianos revelou os fármacos Meropenem (83%), Gentamicina (82%), Imipenem (77%), Colistina (75%), Piperacilina associado ao Tazobactam (73%), Ciprofloxacina (72%), Ceftazidima (60%), Cefepime (60%), Amicacina (70%) e Tigecilina (58%) como mais sensíveis para as bactérias produtoras de ESBL.

Em relação ao perfil de resistência, os antimicrobianos Cefalotina (98%), nitrofurantoína (98%), ampicilina (97%), amoxicilina com clavulanato (97%), cefuroxima (95%), sulfatrimetropima (95%), ácido nalidixico (93%), norfloxacina (90%), e amoxicilina com sulbactam(80%), apresentaram menor efetividade para tratamento de bactérias produtoras de ESBL.

A totalidade dos genes ESBL pesquisados obtiveram identificação positiva. O gene de maior prevalência foi CTX-M, detectado em 85,71% dos achados, o gene TEM correspondeu a 64,28% e SHV em 17,85%. Foram detectadas associações entre eles, e a maior ocorrência foi envolvendo os genes CTX-M e TEM, e a associação CTX e SHV não apresentou nenhuma ocorrência.

As espécies que mais apresentaram os genes foram *A.baumannii* (17,86%), *P.aeruginosa* (17,86%) *C.koseri* (10,71%), *E.cloacae* (7,14%) e *B.cepacia* (7,14%).

É importante salientar situação ocorrida em um paciente utilizando somente corticóides, onde este apresentou a espécie *K.pneumoniae spp* com um gene de resistência CTX-M e após 72h ocorreu o surgimento de *A.baumannii* com os três genes de resistência pesquisados.

Para diminuir a colonização do meio oral, desenvolveu-se um protocolo básico de higiene oral para os pacientes internados no ambiente hospitalar e UTI do Hospital Geral de Roraima apresentado como Apêndice C ao final do trabalho.

PRODUTOS GERADOS

- Artigo:

BRANDÃO, Marcia Brazão e Silva, CAPUCHO, Derlano Bentes, AGUIAR, Edimilla Carneiro da Cunha, ASSIS, Rafael Nascimento de, GRANJA, Fabiana. et al., Isolation of Extended-Spectrum Beta-Lactamases producing strains on effluent of state hospital from Boa Vista-RR. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 21, n. 3, p. 248-258, 2017.

- Patente:

BRANDÃO, Márcia Brazão e Silva; CAPUCHO, Derlano Bentes; GRANJA, Fabiana. Coletor de Efluente em Profundidade. 2018, Brasil. Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR20201800944, título: "Coletor de Efluente em Profundidade", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depositante(s): Universidade Federal de Roraima; Instituto Federal de Roraima, Depósito: 10/05/2018

- Protocolo:

Apêndice C deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- AHMED, O.I. et al. Detection of bla SHV and bla CTX-M genes in ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Egyptian patients with suspected nosocomial infections. **The Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 14, p.277–283, 2013.
- AMARAL, Simone Macedo; CORTÊS, Antonieta de Queiróz; PIRES, Fábio Ramôa. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **J bras pneumol**, v. 35, n. 11, p. 1116-24, 2009.
- AYRES, M., AYRES Jr, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. A. S. **Bioestat 5.0 aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Belém: IDSM, 2007.364p
- BADAVE, Gitanjali Kailas; KULKARNI, Dhananjay. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: an emerging challenge. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 9, n. 1, p. DC08, 2015.
- BALI, E.B et al. Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum β -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n., p. 650-654, april, 2010.
- BASAK, Silpi; SINGH, Priyanka; RAJURKAR, Monali. Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: A study. **Journal of pathogens**, v. 2016, 2016.
- BENACHINMARDI, K. K. et al. “Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Anaerobic Bacteria in Chronic Periodontitis.” **Journal of Indian Society of Periodontology** 18.5 (2014): 567–569. *PMC*. Web. 24 Feb. 2018.
- BLUM, Davi Francisco Casa. Influência da presença de profissionais em odontologia e protocolos para assistência à saúde bucal na equipe de enfermagem da unidade de terapia intensiva. Estudo de levantamento. **Rev Bras Ter Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 391-393, 2017.
- BOYD, N.; NAILOR, M. D. Combination Antibiotic Therapy for Empiric and Definitive Treatment of Gram-Negative Infections: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v.31 n.11, p.1073-1084. 2011
- BRADFORD, P. A. Extended spectrum beta-lactamase in the 21 century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistant threat. **Clinical Microbiol Rev**, v. 14, p. 933-51, 2001.
- BRANDT, Christian et al. In silico serine beta-lactamases analysis reveals a huge potential resistome in environmental and pathogenic species. **Scientific reports**, v. 7, p. 43232, 2017.
- BRANDÃO, Marcia B. e S. et al. Isolation of Extended-Spectrum Beta-Lactamases producing strains on effluent of state hospital from Boa Vista-RR. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 21, n. 3, p. 248-258, 2017.

BRANDÃO, Marcia B. e S. et al. Prevalência de Cepas produtoras de ESBL em pacientes internados no Hospital Geral de Roraima. In: 4º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica – SIMC, 2014, João Pessoa. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia. 2014. p.171-1. Disponível em: <<https://www.sbmicrobiologia.org.br/cdsimc2014/listaresumos.htm>>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (Gipea) e Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde (GGTES). **Investigação e Controle de bactérias Multirresistentes**. Brasília: ANVISA, 2007. 21 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/reniss/manual%20controle_bacterias.pdf>. Acesso em: 15 maio 2016.

BROLUND, Alma et al. Plasmidome-analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* using conventional typing and high-throughput sequencing. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65793, 2013.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.54 n.3, p. 969-976. 2010.

CARMO, S.D et al, Detecção de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em isolados de *escherichia coli* uropatogênicas (UPECS) oriundos de pacientes da comunidade. **Revista de Patologia Tropical**, v.41, n.4, p.419-426, out.-dez. 2012.

CHANDRAMOHAN, L; REVELL, A.P. Prevalence and Molecular Characterization of Extended-Spectrum-_-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in a Pediatric Patient Population. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.56, n.9, p. 4765–4770, September 2012.

CHAPMAN, P. A. et al. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 68, n. 1, p. 11-20, ago. 2001.

CHAVES, J, et al., SHV-1 -Lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.45, n.10, p.2856–2861, Oct 2001.

CLSI. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing**; 22nd information supplement. M100-S22, 2012; 32(3): 20–60.

D'ANGELO, Ryan G. et al. Treatment options for extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC-producing bacteria. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 17, n. 7, p. 953-967, 2016.

DA SILVA, Tatiana Gaffuri et al. Incidence of ventilator-associated pneumonia in an intensive care unit Incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online**, v. 9, n. 4, p. 1121-1125, 2017.

DAVIES, Julian; DAVIES, Dorothy. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DE MORAES, Graciana Maria et al. Infecção ou colonização por micro-organismos resistentes: identificação de preditores. **Acta Paul Enferm**, v. 26, n. 2, p. 185-91, 2013.

DHILLON, Rishi H.-P.; CLARK, John. ESBLs: a clear and present danger?. **Critical care research and practice**, v. 2012, 2011.

DOUGLAS, CW Ian et al. Physiological adaptations of key oral bacteria. In: **Advances in microbial physiology**. Academic Press, 2014. p. 257-335.

FEHLBERG, Lorena Cristina Corrêa et al. Performance of MALDI-ToF MS for species identification of Burkholderia cepacia complex clinical isolates. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 77, n. 2, p. 126-128, 2013.

FERREIRA, Cristina Motta. **Caracterização genética e sensibilidade microbiana das bactérias aeróbicas isoladas de processos infecciosos de pacientes com doenças hematológicas da Fundação HEMOAM**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade do Estado do Amazonas.

FORTALEZA, C. M. C. B. et al. Multi-state survey of healthcare-associated infections in 52 acute care hospitals in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 96, n. 2, p. 139–144, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2017.03.024>

FOURNIER, D. et al. Alternatives to carbapenems in ESBL-producing *Escherichia coli* infections. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 43, p 62–66, 2013.

FUNKE, Guido et al. Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of medically relevant gram-negative rods. **Journal of clinical microbiology**, Washington DC, v. 36, n. 7, p. 1948-1952, jul. 1998.

GALETTI, Renata. **Estudo genético e molecular da disseminação da resistência aos beta-lactâmicos em Pseudomonas aeruginosa**. 2014. Tese (Doutorado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014. doi:10.11606/T.60.2014.tde-17042015-145746. Acesso em: 15-06-2017.

GARROUSTE-ORGEAS, Maïté et al. Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients: a prospective study based on genomic DNA analysis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 156, n. 5, p. 1647-1655, 1997.

GHARRAH, Mustafa Muhammad; MOSTAFA EL-MAHDY, Areej; BARWA, Rasha Fathy. Association between Virulence Factors and Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Klebsiella pneumoniae Compared to Nonproducing Isolates. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2017, 2017.

GOMES-FILHO, Isaac S.; PASSOS, Johelle S.; DA CRUZ, Simone Seixas. Respiratory disease and the role of oral bacteria. **Journal of oral microbiology**, v. 2, 2010.

HALLER, Sebastian et al. What caused the outbreak of ESBL-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing

transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. **BMJ open**, v. 5, n. 5, p. e007397, 2015.

HAZIROLAN, G. et al. Fecal Carriage of Extended-spectrum Beta-lactamase and AmpC Beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a Turkish Community. **Nigerian journal of clinical practice**, v. 21, n. 1, p. 81-86, 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2010. Censo demográfico 2010. www.ibge.gov.br/rr/boavista

JALILIAN, S. and F. Rokh Bakhsh zamin (2017). "Evaluating the ability of Biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Zahedan." *Pars of Jahrom University of Medical Sciences* **15**(1): 36-42.

KIM, Seon-Mi; KIM, Hyeong C.; LEE, Seok-Woo S. Characterization of antibiotic resistance determinants in oral biofilms. **The Journal of Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 595, 2011.

LAGO, A.; et al. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

LAHEIJ A.M.G.A, et al. Healthcare-associated viral and bacterial infections in dentistry. **Journal of Oral Microbiology**. v.4 n.10. doi:10.3402/jom.v4i0.17659, 2012.

LEISTNER, R. et al, Risk Factors Associated with the Community-Acquired Colonization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Positive *Escherichia Coli*. An Exploratory Case Control Study. **Plos One**, v, 8, n. 9, sept 2013.

LEWIS, Kim. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.

LIMA, Marcos Resende Sousa et al. Intervenção em surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro expandido (ESBL) em Unidade de Terapia Intensiva neonatal em Teresina, Piauí, 2010-2011. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 23, n. 1, p. 177-182, 2014

LIVERMORE, D.M. et, al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? **Antimicrob. Agents Chemother.** Advanced Acess. March 2012.

MARCONATTO, Lauri João; KOEHLER, Henrique Soares; MARCUZZO, Leandro Luiz. Incidência de doenças em cebola armazenada na região do alto vale do Itajaí/SC. **Summa phytopathol.**, Botucatu, v. 43, n. 3, p. 243-245, Sept. 2017.

MEYER, G., PICOLI, S.U, Fenótipos de beta-lactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 1, p. 25-31, feb 2011.

MORAIS, Teresa Márcia Nascimento de et al. A importância da atuação odontológica em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 18, n. 4, p. 412-417, 2010.

NEPOMUCENO RM, Miranda CB, Nogueira C, Silva LCF, Silva LD. Fatores de Risco Modificáveis para Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica em Terapia Intensiva. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**. 2014 mar;4 (1): 23-7.

NG, Tat Ming et al. Empiric piperacillin-tazobactam versus carbapenems in the treatment of bacteraemia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. **PLoS One**, v. 11, n. 4, p. e0153696, 2016.

NORDBERG, Viveka et al. High proportion of intestinal colonization with successful epidemic clones of ESBL-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Ecuador. **PLoS one**, v. 8, n. 10, p. e76597, 2013.

NORMAN, Anders; HANSEN, Lars H.; SØRENSEN, Søren J. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, n. 1527, p. 2275-2289, 2009

OVERDEVEST, I. Extended-Spectrum beta-Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n.7, p.1216-1222, July 2011.

PACE, Mariângela Aparecida. **Avaliação clínica e microbiológica da cavidade bucal de pacientes críticos com intubação orotraqueal de um hospital de emergência**. 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PARTRIDGE, Sally R. Resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. **Pathology-Journal of the RCPA**, v. 47, n. 3, p. 276-284, 2015.

PATTARACHAI et al. Molecular Characterization and Epidemiology of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumonia* Isolates Causing Health Care-Associated Infection in Thailand, Where the CTX-M Family Is Endemic. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 5, n.8, p-2818-2824, 2008.

PEREIRA, Juliana Vianna et al. Bacterial diversity in the saliva of patients with different oral hygiene indexes. **Brazilian dental journal**, v. 23, n. 4, p. 409-416, 2012.

PINCUS, David H. Microbial identification using the bioMerieux VITEK®2 System. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**, [S. l.] v. 1, p. 1-32, 2006.

POGUE, Jason M.; COHEN, David A.; MARCHAIM, Dror. Editorial commentary: polymyxin-resistant *Acinetobacter baumannii*: urgent action needed. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60, n. 9, p. 1304, 2015.

Raman, G., Avendano, E., Berger, S., & Menon, V. Appropriate initial antibiotic therapy in hospitalized patients with gram-negative infections: systematic review and meta-analysis. **BMC infectious diseases**, v. 15 n.1, p. 395, 2015.

RICE, L.B.; BONOMO, R.A. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. **Manual of Clinical Microbiology**, 10th Edition. American Society of Microbiology, p.1082-1114. 2011.

ROBERTS, Adam P.; MULLANY, Peter. Oral biofilms: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 12, p. 1441-1450, 2010.

RÔÇAS, Isabela N.; SIQUEIRA JR, José F. Detection of antibiotic resistance genes in samples from acute and chronic endodontic infections and after treatment. **Archives of oral biology**, v. 58, n. 9, p. 1123-1128, 2013.

RYAN, M. P.; ADLEY, C. C. *Sphingomonas paucimobilis*: a persistent Gram-negative nosocomial infectious organism. **Journal of Hospital Infection**, v. 75, n. 3, p. 153-157, 2010.

SADER, Helio S. et al. Antimicrobial activity of ceftolozane/tazobactam tested against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacteriaceae* with various resistance patterns isolated in European hospitals (2011–12). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2713-2722, 2014.

SALVATORE, D. J.; RESMAN-TARGOFF, B. H. Treatment options for urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **J. Academic Hospital Medicine**, v. 7, n. 1, 2015.

SANTOS, Paulo Sérgio da Silva et al. Impact of tongue biofilm removal on mechanically ventilated patients. **Revista Brasileira de terapia intensiva**, v. 25, n. 1, p. 44-48, 2013.

SEEMANN, Rainer et al. Effectiveness of mechanical tongue cleaning on oral levels of volatile sulfur compounds. **The Journal of the American Dental Association**, v. 132, n. 9, p. 1263-1267, 2001.

SILVA, K.C.; LINCOPAN, N., Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48, n. 2, p. 91-99, abril 2012.

SILVA, R. C. G.; SILVA, A. C. O.; OLIVEIRA, S. R. Microbial resistance and frequency of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) in isolated from blood cultures. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, n. 6, p. 421-427, Rio de Janeiro, dez. 2014.

SOMMERSTEIN, R., A. Atkinson, E. F. Lo Priore, A. Kronenberg, J. Marschall and R. Swiss Centre for Antibiotic. "Characterizing non-linear effects of hospitalisation duration on antimicrobial resistance in respiratory isolates: an analysis of a prospective nationwide surveillance system." **Clin Microbiol Infect**, v.24 n.1 p. 45-52, 2018.

SØRAAS, Arne Vasli Lund. **Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae. Aspects on carriage, infection and treatment.** 2014.

SOUZA, Aline Schio de. Prevalência de pneumonia associada à assistência à saúde em unidades de terapia intensiva. 2012.Mestrado: **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste**

THENMOZHI, S. et al. Antibiotic resistance mechanism of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in clinical field: A review. **Int J Pure Appl Biosci**, v. 2, p. 207-226, 2014.

TSENG, S.P., et al. The contribution of antibiotic resistance mechanisms in clinical *Burkholderia cepacia complex* isolates: an emphasis on efflux pump activity. **PLoS One**, n.9 v.8, e104986. 2014

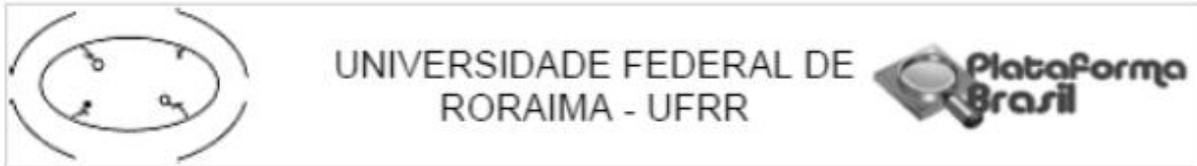
VAIDYA, Varsha K. et al. Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum beta lactamase-producing enterobacteriaceae. **Journal of laboratory physicians**, v. 3, n. 1, p. 37, 2011

VIDAL, Claudia Fernanda de Lacerda et al. Impact of oral hygiene involving toothbrushing versus chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia: a randomized study. **BMC infectious diseases**, v. 17, n. 1, p. 112, 2017.

ZARFEL G. et al, Comparison of extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) carrying *Escherichia coli* from sewage sludge and human urinary tract infection. **Environmental Pollution**, v. 137, p; 192-199, Feb 2013.

ZIJNGE, Vincent et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9321, 2010.

ANEXO 1: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DE PERFIL GENÉTICO DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO EM PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA DE UM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DE

Pesquisador: DERLANO BENTES CAPUCHO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 58466116.2.0000.5302

Instituição Proponente: Universidade Federal de Roraima - UFR

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.730.739

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BOA VISTA, 16 de Setembro de 2016

Assinado por:
Ijanílio Gabriel de Araújo
 (Coordenador)

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, UFRR, Campus Paricarana, Bloco PRPPG/UFRR, Sala CEP/UFRR.
Bairro: Aeroporto **CEP:** 69.304-000
UF: RR **Município:** BOA VISTA
Telefone: (95)3621-3112 **Fax:** (95)3621-3112 **E-mail:** coep@ufr.br

APÊNDICE A: Termo de consentimento livre e esclarecido aplicado à pesquisa

Declaro que fui satisfatoriamente esclarecido pelos pesquisadores Fabiana Granja, Márcia Brazão e Silva Brandão e Derlano Bentes Capucho, em relação a minha participação no projeto de pesquisa intitulado “**Caracterização de perfil genético de bactérias produtoras de Beta-lactamase de espectro estendido em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva de um hospital de referência de Roraima**”, estou ciente que o estudo deverá esclarecer questões sobre o adoecimento ou agravo no quadro dos pacientes, tais como:

- (1) Caracterizar o perfil dos microorganismos encontrados na cavidade oral que possam servir de patógenos principais em caso de pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM); (2) Determinar qual infecção pode estar causando o agravo no estado geral do paciente através do uso de técnicas de detecção por Biologia Molecular, indicando o melhor tratamento para o controle ou erradicação do foco infeccioso causador da patologia; (3) Motivar a presença do Cirurgião-Dentista na equipe multiprofissional que atua na Unidade de Terapia Intensiva e mensurar o ganho no tratamento preventivo dos pacientes;

Permito que o pesquisador tenha acesso ao meu prontuário médico e pesquise dados de identificação, como nome, idade, faixa etária, sexo, cor/raça entre outros e os dados médicos relativos a presença de consciência, sedação, resultados de exames clínicos, sorológicos, laboratoriais, de biópsias e tratamento.

Permito que sejam coletados saliva da boca com swab estéril descartável, e se houver necessidade pelo tratamento do paciente. Este procedimento pode causar um leve desconforto, como ânsia de vômito. Poderá ainda, se necessário haver a coleta de secreção traqueal, e esta é procedimento de rotina do paciente intubado e seu uso será apenas comparativo com os resultados obtidos da saliva. Estou ciente que o resultado da genotipagem bacteriana além dos resultados de resistência e sensibilidade aos antimicrobianos testados poderão ser disponibilizados para o médico que me acompanha. O resultado não será disponibilizado para outras pessoas e meu nome também não será revelado. Estou ciente e autorizo a realização dos procedimentos acima citados e a utilização dos dados originados destes procedimentos para fins didáticos e de divulgação em revistas científicas brasileiras ou estrangeiras contanto que sejam mantidas em sigilo informações relacionadas à minha privacidade, bem como garantido meu direito de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de dúvidas acerca dos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, além de que se cumpra a legislação em caso de dano. É possível retirar o meu consentimento a qualquer hora e deixar de participar do estudo sem que isso traga qualquer prejuízo à minha pessoa. O (a) Sr (a) não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Desta forma, concordo voluntariamente e dou meu consentimento, sem ter sido submetido a qualquer tipo de pressão ou coação. Caso eu não queira participar ou se quiser desistir em qualquer momento, isso não vai implicar em nenhum prejuízo de qualquer natureza para minha pessoa ou de meus familiares. Eu concordo em participar deste estudo, assinando esse termo em duas vias, ficando uma cópia comigo. Eu, _____

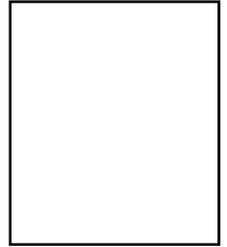
_____, após ter lido e entendido as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo com Fabiana Granja, Márcia Brazão e Silva Brandão e Derlano Bentes Capucho, CONCORDO VOLUNTARIAMENTE, participar do mesmo.

Boa Vista/RR, ____/____/_____

Assinatura (do pesquisado ou responsável) ou impressão datiloscópica

Nome Legível: _____

RG: _____



Eu, **Derlano Bentes Capucho** declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao paciente. Para maiores esclarecimentos, entrar em contato com os pesquisadores nos endereços abaixo relacionados:

Nome: **Derlano Bentes Capucho, Márcia Brazão e Silva Brandão** ou **Fabiana Granja**.

Endereço: Av. Cap. Ene Garcez, nº 2413, CEP 69.304-000, Campus Paricarana

Bairro: Aeroporto Cidade: Boa Vista UF: RR

Fones: (95) 3621 – 3451/ 95-988040174

e-mail: fabiana.granja@ufr.br

APÊNDICE B: Ficha clínica para coleta dos dados dos prontuários dos pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO	Nome completo:				Data de Nascimento:					
	Sexo:				Prontuário:					
	Contato Familiar:									
DADOS DE INTERNAÇÃO	Data da admissão no Hospital						Dias			
	Data da entrada na UTI						Dias			
	Leito:				UTI:					
	Motivo da internação na UTI									
DADOS DE SAÚDE	História da Moléstia Atual									
	Diagnóstico									
	Comorbidades presentes:									
	Diabetes	HAS	Cardiopatias	Nefropatias	Câncer	Cirurgias				
	Doença Pulmonar		Outra:							
	Prognóstico:									
	Histórico de patologia pregressa:									
	Acesso/Local/Dias:				Superficial		Profundo			
	FC:		FR:		Temp.:		PA.:			
Nível de sedação	Escala de Ramsay				1	2	3	4	5	6
Nível de consciência	Escala de Coma de Glasgow:									
	Abertura Ocular:				1	2	3	4		
	Resposta Verbal:				1	2	3	4	5	
	Resposta motora:				1	2	3	4	5	6
Exame Físico	Estado geral									
	EEG			BEG		REG		MEG		
	Estado Neurológico:									
	Acordado	Sonolento	Orientado	Colaborativo	Ativo	Sedado	Hipoativo	Arreativo		
	Avaliação das Secreções Traqueais:				Tosse:					
	Cor:				Eficaz		Ineficaz			
	Quantidade:				Produtiva	Seca	Ladrante			
	Viscosidade:				Duração					
	Odor:									
	Febre:		S	N	Quanto:					
	Intubação		S	N	Data da intubação:					

	Tipo de Intubação	Nasogástrica	Endotraqueal	Outra:	
	Dias de Intubação				
	Dispositivos/Sondas	S	N		
	Sonda Vesical de demora				
	Acesso Venoso Central				
	Drenos				
Medicações Administradas	Antimicrobiano(s)	Posologia		Tempo de tratamento	
	Imunossupressores	Posologia		Tempo de tratamento	
Ocorrências de Infecções	Sítio	Data	Agente Isolado		
Anamnese Odontológica	Dentição	Presente	Parcial	Ausente	
	Sítios infecciosos	Mucosa	Língua	Dente	
	Origem	Periodontal	Apical		
	Lesões	Tipo:			
		Localização:			
	Está em acompanhamento do setor (OH)		S	N	
	Faz uso de medicação para controle Salivar		S	N	
	Qual?				
	Apresenta Xerostomia		S	N	
Coletas de Amostras do Paciente	Coleta de mucosa oral realizada em				
	Características Fenotípicas				
	Perfil de Resistência				
	Perfil de Sensibilidade				
	Gene(s) encontrado(s)		TEM	CTX-M	SHV
	OBS:				
	Coleta de mucosa oral realizada em				
	Características Fenotípicas				
	Perfil de Resistência				
	Perfil de Sensibilidade				
	Gene(s) encontrado(s)		TEM	CTX-M	SHV
	OBS:				
	Coleta de secreção traqueal realizada em				
	Características Fenotípicas				
	Perfil de Resistência				
	Perfil de Sensibilidade				
	Gene(s) encontrado(s)		TEM	CTX-M	SHV
OBS:					

APÊNDICE C: PROTOCOLO BÁSICO PARA O ATENDIMENTO DO PACIENTE EM AMBIENTE HOSPITALAR E UTI – HGR

Paramentação para consulta/atendimento:

Pacientes internados em UTI ou impossibilitados do deslocamento ao consultório odontológico de apoio:

- Gorro.
- Luva para procedimento (consulta).
- Luva estéril (intervenção).
- Jaleco descartável.
- Máscara tripla descartável.
- Máscara N95 (isolamento e casos específicos).
- Palitos de madeira descartáveis autoclavados para abertura e/ou estabilização bucal (pacote com 10) ou inspeção clínica (individual).
- Luz de cabeça.
- Kit clínico de consulta e correlatos ao procedimento a ser executado, embalados e autoclavados individualmente.
- Kit de higiene oral – Escova dental, raspador de língua, sugador descartável e digluconato de clorexidina 0,12%

Consulta Odontológica inicial

A consulta odontológica inicial realizada nos pacientes de UTI compreende os seguintes procedimentos:

- Verificação OBRIGATÓRIA do prontuário do paciente com a finalidade de identificar a Doença primária, condições ou características críticas específicas e verificar o estado geral do paciente, para determinar o protocolo adequado para higiene oral
- Determinar a condição de saúde bucal: Exame extra-oral, avaliar o nível de doença periodontal presentes e obter o ICPO-D, bem como preenchimento de odontograma com os dados clínicos disponíveis ao momento do exame clínico inicial em ficha apropriada.
- Controlar a quantidade de placa bacteriana através do protocolo de higiene oral (abaixo), instruindo a equipe ou realizando-o na verificação de insucesso neste controle.
- Realizar diagnóstico e tratamento de infecções odontogênicas e não odontogênicas à medida do possível.
- Avaliar a necessidade de remoção de aparatologia ortodôntica fixa, próteses parafusadas ou restaurações metálicas, bem como de outras situações que possam interferir em exames de imagem ou causar lesões em tecidos moles, incluindo os dentes hígidos ou não, com autorização prévia do(s) responsável(is) pelo paciente, em consonância com o quadro geral e liberação da equipe assistente (definição de melhor momento para atuação).
- Avaliar a necessidade de instalação de aparelhos protetores bucais para prevenir ou tratar lesões traumáticas em tecidos moles.
- Avaliar a necessidade da hidratação labial diária.

Protocolo de Higiene Oral

Pacientes intubados e/ou sedados:

- Verificar a angulação da posição de decúbito do paciente. Para evitar o risco de pneumonia aspirativa, recomenda-se pelo menos 30° a 40° na angulação da cabeça do paciente, bem como solicitar informações da situação do *cuff* do tubo oro/endotraqueal do ventilador mecânico prévio a higienização/procedimento (deve ser suficiente para permitir a perfusão da mucosa, prevenir o vazamento de ar e impedir a aspiração de secreções).
1. LAVAR CORRETAMENTE AS MÃOS E APLICAR ÁLCOOL 70°.
 2. Calçar luvas de procedimento: na ocorrência de qualquer contato com superfícies próximas (cama, tubo, suporte) ao paciente previamente ao procedimento, as luvas devem ser trocadas.
 3. Aspirar na região da orofaringe antes do procedimento e permanecer com a aspiração durante o procedimento.
 4. Embeber escova de dentes e/ou boneca de gaze (menor eficácia) e/ou swab (menor eficácia) em solução não alcoólica de digluconato de clorexidina 0,12% e realizar os seguintes movimentos **SEMPRE NO SENTIDO PÓSTERO-ANTERIOR**:
 - Friccionar os vestíbulos e a mucosa jugal
 - Friccionar o palato
 - Friccionar as superfícies vestibulares, linguais e oclusais dos dentes
 - Friccionar o tubo orotraqueal
 5. Passar raspador no dorso lingual em sentido póstero anterior
 6. Aspirar na região da orofaringe durante todo o procedimento
 7. Lavar as mãos ou aplicar álcool 70 após a remoção das luvas

Pacientes não intubados

Caso o paciente esteja recebendo alimentação por via oral, deve-se escovar os dentes com escova dental 3 vezes ao dia após as principais refeições. Caso o paciente não esteja se alimentando por via oral, os procedimentos de higiene oral devem ser realizados 2 vezes ao dia.