



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Marcia Bertolossi Hirata

Eficácia de um protocolo de higiene bucal com utilização de solução de clorexidina a 0,12% na prevenção de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVM) e os efeitos sobre a microbiota da mucosa bucal de pacientes internados em unidades de terapia intensiva

Rio de Janeiro

2014

Marcia Bertolossi Hirata

Eficácia de um protocolo de higiene bucal com utilização de solução de clorexidina a 0,12% na prevenção de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVM) e os efeitos sobre a microbiota da mucosa bucal de pacientes internados em unidades de terapia intensiva

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientador: Prof.^o Dr. Raphael Hirata Junior

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

H668 Hirata, Marcia Bertolossi.

Eficácia de um protocolo de higiene bucal com utilização de solução de clorexidina a 0,12% na prevenção de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVM) e os efeitos sobre a microbiota da mucosa bucal de pacientes internados em unidades de terapia intensiva /Marcia Bertolossi Hirata. – 2014.

77f

Orientadora: Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Coorientador: Raphael Hirata Junior

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Pneumonias - Teses. 2. Clorexidina - Teses. 3. Higiene bucal - Teses. 4. Unidades de terapia intensiva - Teses. 5. Mucosa bucal - Patogenicidade - Teses. I. Guaraldi, Ana Luíza de Mattos. II. Hirata Júnior, Raphael. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.314-084

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Marcia Bertolossi Hirata

Eficácia de um protocolo de higiene bucal com utilização de solução de clorexidina a 0,12% na prevenção de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVM) e os efeitos sobre a microbiota da mucosa bucal de pacientes internados em unidades de terapia intensiva

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2014.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Luiza de Mattos Guaraldi
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Coorientador: Prof. Dr. Raphael Hirata Júnior
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. José Augusto Adler Pereira
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Rogério Lopes Rufino Alves
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Simone Soares Marques Paiva

Universidade Fundação Educacional Serra dos Órgãos

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Tenho muito a celebrar e agradecer. Dedico esse trabalho às pessoas especiais da minha vida: aos meus filhos, meus tesouros, meu maior legado para o mundo, Bernardo e Douglas. Acostumados com a mãe inquieta e nunca me cobrando pelas horas que “roubei” do nosso convívio, sempre demonstraram respeito, orgulho e amor por mim, exigente como todas as mães, mas amorosa e consciente de ter os melhores filhos do mundo!

Dedico também aos meus amados pais, Alda e Raphael Hirata, este o pai mais amigo, companheiro, protetor e educador que alguém poderia ter. Ensinou-me a pensar grande!

Ao meu irmão Raphael a quem devo e dedico a melhor parte deste aprendizado. Meu parceiro, amigo e suporte. Empurrando-me para frente, obrigando a combater e estimulando a tentar ser tão brilhante e nobre quanto ele é.

É muita responsabilidade e compromisso. Mas aqui estou: com certeza melhor e mais forte, por vocês, pelo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

O Apóstolo São Paulo diz em um dos momentos mais difíceis da vida da Igreja Tessalônica: 1 Tessalonicenses 5:18. Em tudo, dai graças, porque esta é a vontade de Deus em Cristo Jesus para convosco. A vontade de Deus tem muitas coisas inclusas: ela é boa, é perfeita e é agradável, e quando você entende o significado da vontade de Deus, você percebe que dentro destas muitas coisas, que são parte da vontade de Deus, há uma figura que tem que ser básica na nossas vidas: **a gratidão**. Durante a minha jornada até esse tão esperado momento, muitos foram os obstáculos a serem transpostos. Situações tão desafiadoras que pensei que não fosse conseguir chegar até aqui. Mas nessas horas Ele enviou alguns anjos para me socorrer e estes fizeram um ótimo trabalho. Assim meu primeiro agradecimento só poderia ser ao meu Deus, em tudo e por tudo!

Agradeço, de forma especial, aos meus excepcionais orientadores, Prof^ª Ana Luiza de Mattos Guaraldi e Prof. Raphael Hirata Júnior, pesquisadores e educadores brilhantes, que com carinho, paciência e imbatível garra, me conduziram até aqui. Obrigada pela confiança em mim depositada. Minha gratidão para sempre!

Elencar todos os anjos que me ajudaram, sem esquecer-se de nenhum, também não é fácil e já peço desculpas se isso acontecer. Destaco aqui a minha querida amiga Dra. Simone Soares Marques Paiva, a Cap. Simone e também a competentiíssima Dra. Déborah Leite. Ambas foram fundamentais na realização e interpretação dos experimentos de detecção molecular, realizados no LEMM (Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular), no Instituto de Microbiologia da UFRJ, sob autorização do seu chefe Dr. Alexandre Soares Rosado a quem também agradeço.

Devoto também minha gratidão aos meus colegas do Comando da Aeronáutica, onde sirvo com alegria e dedicação, e que me possibilitou um grande aprendizado pessoal e principalmente profissional. Agradeço ao Brig Med Celso Gonçalves Bencardino, pela confiança no trabalho que seria desenvolvido, autorizando-me a empreendê-lo; ao Cel. Int. Gilberto Aguiar que me ajudou administrativamente a contornar uma dificuldade; à equipe do CTI do Hospital Central da Aeronáutica, personificada no combativo Cap Med Pedro Luiz Naglis Tibúrcio e seus comandados e que receberam os oficiais-dentistas de braços abertos; à Cap. Mariana pelo incentivo e colaboração prestimosa; à querida CCIH do HCA, da qual sou membro, representada pelo Ten. Med. Luiggi Miguez Dantas e o o incansável Enf. João Luiz Tavares, pelo apoio incondicional que me deram. Meus mais sinceros agradecimentos vão

também às brilhantes oficiais- dentistas, colegas e amigas, 1º Ten. Josiane Sá e 1º Ten. Isabela Castro, imbatíveis, incansáveis, valentes e obstinadas na construção da Odontologia Hospitalar do HCA: nossa luta continua! À Dra. Cláudia Tonietto e 1º Ten. Renata Melo. A elas, nunca poderei ser suficientemente grata. Também agradeço a dois grandes colegas e amigos, Cel Dent. José Maceira Fernandez e Cel Dent. Rogério Oliveira de Souza, que muito fizeram para me ajudar nos meus horários para que eu pudesse cursar as disciplinas do Curso.

Destaco também o apoio financeiro da FAPERJ, do CNPq, da CAPES, da SR-2/UERJ e do Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX), pois a busca pelo conhecimento também necessita recursos.

Aos professores e funcionários do PGCM e UERJ pela prestimosa colaboração na construção deste projeto e a todos os colegas do Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica.

Se deixei de nomear algum anjo, sinta-se também homenageado e considere-se co-autor deste trabalho.

Nem tudo o que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.

Albert Einstein

RESUMO

HIRATA, Marcia Bertolossi. Eficácia de um protocolo de higiene bucal com utilização de solução de clorexidina a 0,12% na prevenção de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVM) e os efeitos sobre a microbiota da mucosa bucal de pacientes internados em unidades de terapia intensiva. 2014. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A presente investigação teve como objetivo avaliar a prática de cirurgiões dentistas em uma unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital militar, o estabelecimento de um protocolo de higiene oral e os seus efeitos sobre a redução de pneumonias associadas à ventilação mecânica (PAVM). As percepções da equipe da UTI sobre as atividades dos cirurgiões dentistas também foram avaliadas por meio de um questionário. O perfil de colonização microbiana da mucosa oral antes e depois do estabelecimento das medidas de higiene oral também foi avaliado tanto por diluição e plaqueamento em meios de cultura microbiológicos seletivos e enriquecidos e através da amplificação pelo método de PCR e eletroforese em gel desnaturante em gradiente (DGGE), subsequente ao sequenciamento dos amplicons. A carga microbiana foi avaliada após a contagem de placas de agar e através da amplificação por PCR em tempo real (qPCR) do gene *rrs* nas amostras. O protocolo de higiene oral, realizado pelos cirurgiões dentistas, foi capaz de reduzir a incidência de PAVM ($p < 0,05$). O questionário revelou que a modificação da halitose foi percebida por 93,33% dos participantes. A redução da ocorrência das úlceras orais e dos lábios durante a internação dos pacientes foi observada por 80% da equipe da UTI. Foi observada a redução da produção das secreções nasais e bucais por 70% da equipe dos profissionais da UTI. Para 86,66% dos participantes a assistência aos pacientes tornou-se mais agradável após a instituição dos cuidados bucais. O protocolo, realizado com a utilização de solução 0,12% de clorexidina, não foi capaz de evitar a colonização da mucosa oral por patógenos microbianos usualmente encontrados no ambiente hospitalar tais como os bastonetes Gram-negativos entéricos e não fermentadores, nem foi capaz de eliminá-los quando tais micro-organismos já se encontravam presentes antes dos procedimentos de higiene bucal. Alguns Bastonetes Gram-positivos (*Lactobacillus sp* e corinebactérias) e *Staphylococcus epidermidis* permaneceram após a realização dos procedimentos. O protocolo de higiene oral permitiu a redução da carga microbiana na mucosa oral de 50% dos pacientes considerando-se o método de contagem microbiana e para 35% dos pacientes pela avaliação dos números de cópias de genes *rrs* através de qPCR. Em conclusão, o protocolo de higiene oral desenvolvido pelos cirurgiões dentistas foi capaz de reduzir a incidência de PAV na UTI, embora não tenha sido capaz de prevenir a colonização da mucosa oral por supostos patógenos microbianos. O protocolo de higiene oral com a participação ativa dos cirurgiões dentistas foi bem aceito pelos profissionais da UTI e foi capaz de melhorar a qualidade da assistência aos pacientes críticos.

Palavras-chave: Pneumonias associadas ao uso de ventilação mecânica. Terapia intensiva. Clorexidina. Microbiota oral. Identificação microbiana por DGGE. Protocolo de higiene oral.

ABSTRACT

HIRATA, Marcia Bertolossi. **Efficacy of a standard oral hygiene protocol with 0.12% chlorhexidine gluconate in preventing ventilator associated pneumonia (VAP) and the effects on oral microbiota among intensive care unit patients.** 2014. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

This investigation aimed to evaluate the practice of dentists in an intensive care unit (ICU) of a military hospital, the establishment of a protocol for oral hygiene, and the effect of the protocol on the reduction of ventilator associated pneumonia (VAP) after the introduction of the oral hygiene protocol. The opinion of the ICU staff about the activity of the dentists was also evaluated by means of a questionnaire. In addition, the microbial colonization profile of the oral mucosa before and after the establishment of the oral hygiene measures was evaluated by means of both dilution and plating the samples in microbiological culture mediums (both selective and rich agar media) and DGGE technique, with sequencing of amplicons. The microbial load was evaluated after counting agar plates and by real time *rrs* gene PCR amplification (qPCR) in the samples. The oral hygiene protocol performed by dentists was capable to reduce the incidence of VAP ($p < 0.05$). The questionnaire revealed that the change of the oral odor was noticed by 93.33% of the participants. The reduction of oral and lip ulcers during the hospitalization of the patients was observed by 80% of the staff. The patients were observed to reduce the production of oral and nasal secretions after the establishment of the oral hygiene procedures by 70% of the ICU professionals. The approach to the patients developed by the staff became more pleasant after the establishment of the oral protocol for 86.66%. The protocol, with the use of 0,12% chlorhexidine solution, was not capable to avoid the colonization of the oral mucosa by the microbial pathogens usually found in nosocomial environment, in especial Gram-negative enteric and non-fermentative rods, nor eliminated these organisms previously found before the oral care procedures. Gram-positive rods (*Lactobacillus sp.*, and corynebacteria) and *Staphylococcus epidermidis* remained after the procedures. The protocol reduced the microbial load in the oral mucosa of 50% of the patients considering the microbial counting and in 35% of the patients evaluated by the numbers of copies of *rrs* genes by qPCR. In conclusion, the oral hygiene protocol developed by dentists was capable to reduce the incidence of VAP in the studied ICU, though was not capable to prevent the colonization of oral mucosa by putative microbial pathogens. The oral hygiene protocol with active participation of dentists was well accepted by the ICU professionals and was capable to improve the quality of assistance to critically ill patients.

Keywords: Ventilator associated pneumonia. Intensive care. Chlorhexidine. Oral Microbiota. DGGE microbial identification. Oral hygiene protocol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica por 1000 dias de ventilação mecânica durante o período de estudo (A). - Densidade de utilização de ventilação mecânica durante o período de estudo (%)(B). Ano em que os cirurgiões-dentistas foram admitidos na UTI.....

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Questionário aplicado aos profissionais em atuação na UTI e os percentuais das repostas às questões assertivas.....	29
Tabela 2 –	Contagem de micro-organismos aeróbios viáveis no início (A) e após quatro dias (B) de aplicação dos procedimentos de higiene oral. AS- Contagem de totais; ACT- Contagem de bastonetes Gram-positivos irregulares; MS- Contagem de estreptococos orais; MCK- Contagem de Bastonetes Gram-negativos; CHA- Contagem de estafilococos/enterococos.....	32
Tabela 3 –	Espécies encontradas após sequenciamento dos amplicons obtidos a partir da reação de amplificação utilizando a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante- DGGE.....	34
Tabela 4 –	Comparação entre as contagens de micro-organismos viáveis e o perfil de amplificação na reação de PCR em tempo real (qPCR), em número de cópias por amostra, no início (A) e após quatro dias (B) de aplicação dos procedimentos de higiene oral.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACT	Agar Chocolate Telurito de Potássio
Agar MCK	Agar-McConkey
ampC	cefalosporinase cujo gen está presente no cromossoma de enterobactérias
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAS	Comissão de Assuntos Sociais do Senado Federal
CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
COMAER	Comando da Aeronáutica
ctxM	Beta-lactamase de espectro estendido do tipo ctxM
DGGE	Eletroforese em Gel Desnaturante em Gradiente
DIRSA	Diretoria de Saúde da Aeronáutica
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
GC	Guanina-Citosina
HCA	Hospital Central da Aeronáutica
ICU	<i>Intensive Care Unit</i>
IL1- β	Interleucina 1 β
KPC	<i>K. pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
MRSA	<i>S. aureus</i> Resistente à Meticilina
MSSA	<i>S. aureus</i> Sensível à Meticilina
NMS	Ordenação Multidimensional Não Métrica
NNISS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance System</i>
PAVM	Pneumonias Associadas à Ventilação Mecânica
PBS	Solução Salina Tamponada
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia de Polimerase)
qPCR	<i>Polymerase Chain Reaction in Real Time</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
<i>rrs</i>	região conservada do RNA ribossomal 16S
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	OBJETIVOS	21
1.1	Geral	21
1.2	Específicos	21
2	MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1	Dados relativos às pneumonias por utilização de ventilação mecânica	22
2.2	Descrição do protocolo de higiene oral	22
2.3	Aceitação dos procedimentos realizados nas UTI por cirurgiões dentistas através da aplicação de questionário	23
2.4	Seleção dos pacientes para coleta de material	23
2.5	Extração e quantificação do DNA no extrato	24
2.6	Amplificação pelo PCR e análise pelo DGGE	24
2.7	Reação de amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (rrs) por PCR em tempo real	25
2.8	Análise estatística	26
2.9	Aspectos éticos	26
3	RESULTADOS	27
3.1	Efeito dos cuidados de higiene bucal sobre as taxas de PAVM	27
3.2	Opinião dos Profissionais da Equipe da UTI com relação aos procedimentos de cuidados orais	27
3.3	Contagem de micro-organismos aeróbios/facultativos da mucosa bucal dos pacientes internados na UTI	30
3.4	Identificação das espécies pelo DGGE	31
3.5	Determinação da carga microbiana das amostras de mucosa bucal através da amplificação em tempo real	33
4	DISCUSSÃO	37
	CONCLUSÕES	44
	REFERÊNCIAS	45
	APÊNDICE – Questionário e TCLE	56
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética e TCLE	58
	ANEXO B - Formato final do 1^o artigo científico submetido	62

INTRODUÇÃO

A cavidade oral é capaz de albergar uma grande diversidade de microrganismos em suas superfícies, sendo sujeita a variações na sua constituição ao longo do tempo e relacionadas ao uso de agentes químicos, antimicrobianos de uso local e sistêmico, hábitos alimentares e condições adversas de higiene, procedimentos quimioterapêuticos, entre outros (Gendron et al., 2000).

Indubitavelmente, bactérias patogênicas da microbiota são os fatores primários na etiologia das doenças da cavidade bucal e sistêmica. Microrganismos e/ou seus produtos são capazes de ativar células na submucosa oral e induzir a expressão de enzimas hidrolíticas para estruturas de matriz extracelular e/ou induzir resposta imune com a liberação de citocinas por linfócitos e macrófagos. As citocinas podem subsequentemente ativar outras vias para a degradação de estruturas teciduais destacando-se as metaloproteinases, serino-proteases derivadas das vias fagocíticas dos neutrófilos e da ativação do plasminogênio. Em instâncias posteriores, citocinas tais como IL-1 β e TNF α , também podem induzir a morte celular epitelial acarretando a substituição celular, modificando os perfis de receptores de superfície para patógenos diversos (Birkedal-Hansen, 1993; Kornman et al., 1997).

Foi reconhecido que infecções da cavidade oral, especialmente as periodontites, podem afetar o curso e patogênese de várias doenças sistêmicas, como doença cardiovascular, pneumonia bacteriana e *Diabetes mellitus* (Bosch et al., 2003). Diversos mecanismos de plausibilidade biológica têm sido propostos para justificar a associação entre processos periodontais e as doenças respiratórias. A atividade enzimática hidrolítica está aumentada em indivíduos com periodontites, podendo facilitar assim, a adesão de patógenos às estruturas da mucosa bucal, modificando, dessa forma, os padrões de colonização da orofaringe (Paju & Scannapieco, 2007).

Uma forte correlação epidemiológica tem sido encontrada entre pacientes com doenças periodontais e doenças coronarianas. Acredita-se que os patógenos periodontais ativem a produção local ou sistêmica (após alcançarem a corrente sanguínea) de altos níveis de citocinas. Dentre tais mediadores, o fator de necrose tumoral α (TNF α) e a interleucina 1 β (IL1- β) teriam a capacidade de iniciar ou induzir a progressão das condições associadas à aterosclerose, favorecendo as doenças coronarianas (Beck et al., 1996; Meyer & Fives-Taylor, 1998). Além disso, a migração bacteriana de bolsas periodontais para a corrente sanguínea tem sido associada a patologias cardiovasculares e endocardites bacterianas. A capacidade de

Porphyromonas gingivalis de invadir células endoteliais tem sido apontada como um mecanismo crítico nas patologias cardiovasculares (Deshpande *et al.*, 1999). A análise genética de amostra de *A. actinomycetencomitans* isolada de aneurisma aórtico micótico confirmou a identidade clonal com uma amostra isolada da cavidade oral do mesmo paciente (Martin *et al.*, 1998).

Outra correlação das doenças periodontais com manifestações sistêmicas tem sido a ocorrência de nascimento prematuro e com redução do peso em parturientes que apresentam doença periodontal na cavidade oral, sem a presença de outros fatores de risco. Foi sugerido que as doenças periodontais são fontes crônicas de lipopolissacarídeos com a capacidade de estimular a produção de IL1- β e prostaglandina E₂, moléculas do hospedeiro associadas ao parto prematuro (Offenbacher *et al.*, 1996).

A cavidade oral e faringe também abrigam microrganismos capazes de causar quadros de endocardites infecciosas. Destacam-se, dentre as espécies abundantes nestes sítios isoladas regularmente de quadros de endocardites, os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, estreptococos alfa-hemolíticos (anteriormente designados *Streptococcus viridans*, que abrigam mais de 20 espécies do gênero), *Enterococcus faecalis*, *Granulicatella sp* e *Abiotrophia sp* (variantes nutricionais dos *Streptococcus*), *Corynebacterium sp*, entre outras espécies (Pierce *et al.*, 2012; Westphal *et al.*, 2009; Mc Donald, 2009).

Cavidade oral e infecções do trato respiratório inferior

As infecções do trato respiratório podem ter diversas apresentações clínicas, desde rinites, faringites, sinusites e tonsilites a infecções de maior gravidade tais como os abscessos pulmonares e pneumonia. Estima-se que 1/3 dos casos de abscessos pulmonares sejam causados por microrganismos que colonizam a cavidade oral (Rams & Slots, 1992).

As pneumonias são causas importantes de morbidade e mortalidade em todo mundo e podem ser causadas por diversos agentes etiológicos. A pneumonia bacteriana é classificada como comunitária ou hospitalar (nosocomial) (Niederman *et al.*, 2001). As pneumonias também constituem a segunda infecção mais comum em pacientes institucionalizados e em asilos, casas de retiro e abrigo para idosos, sendo responsável por 10 a 15% das infecções hospitalares com mortalidade variando de 20 a 50% nesses indivíduos (Mojon, 2002).

A pneumonia bacteriana comunitária é causada pela aspiração de microrganismos que usualmente colonizam as vias aéreas superiores/cavidade oral tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, e *Mycoplasma pneumoniae* (Mandell et al., 2007). As pneumonias comunitárias são importante causa de morbidade e mortalidade em todas as faixas etárias e, quando da evolução grave com falência respiratória e sepse, podem necessitar de cuidado intensivo (de Castro & Torres, 2003). Em tais situações a mortalidade pode variar entre 20 a 54% (Boersma, 1999). Um estudo mostrou que o tratamento antimicrobiano empírico foi importante na redução da evolução das pneumonias comunitárias para os quadros mais graves que necessitaram da internação do paciente (Queen et al., 2014).

Em contraste com a pneumonia comunitária, a pneumonia hospitalar é geralmente causada por microrganismos que não são comumente encontrados na microbiota anfibiótica da orofaringe humana em condições de saúde (Scannapieco, 1999), incluindo patógenos oportunistas tais como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter sp.*, e bactérias entéricas Gram-negativas incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter sp.* A pneumonia hospitalar ocorre após 48 horas da admissão hospitalar dos pacientes nas unidades de internação (enfermaria ou quarto), ainda não intubados (American Thoracic Society, 2005). Quando encaminhados às unidades de terapia intensiva e mantidos sob ventilação mecânica, o desenvolvimento de pneumonia associada à ventilação mecânica também é considerada de natureza hospitalar e será abordada abaixo.

Os relatos de isolamento de microrganismos anaeróbios estritos de casos de pneumonias têm aumentado e o biofilme dentário é aparentemente uma fonte natural de tais microrganismos, particularmente nos pacientes com doenças periodontais (Scannapieco & Myllote, 1996; Scannapieco et al. 1998; Scannapieco, 1999; Yamasaki et al., 2013). A quantidade de biofilme dental em pacientes de UTI aumenta com o período de internação e, paralelamente, ocorre aumento na probabilidade de o biofilme dental ser colonizado por patógenos respiratórios potenciais (Fourrier et al., 1998). Tal aspecto torna-se relevante uma vez que, nos pacientes que necessitam de ventilação mecânica, a colonização da orofaringe por microrganismos Gram-negativos entéricos usualmente ocorre nas primeiras 48 a 72 horas após a admissão na UTI (Treloar & Stechmiller, 1995). Tais microrganismos presentes na orofaringe podem alcançar o trato respiratório inferior através da passagem das secreções orofaríngeas infiltrando-se ao longo da parede dos tubos e balonete (*cuff*) endotraqueais (Genuit et al., 2001). A pneumonia associada à respiração artificial acomete 20 a 25% dos pacientes que necessitam deste recurso, está associada a uma taxa de mortalidade de 50 a 80% (Treloar & Stechmiller, 1995).

Estudos vêm demonstrando a ocorrência subgingival de bactérias das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* em indivíduos portadores de periodontite crônica. Uma vez que tais microrganismos estão frequentemente associados com infecções sistêmicas graves em pacientes imunocomprometidos tais como os internados em unidades de terapia intensiva, relevando a possibilidade dos sítios de doença periodontal servirem de reservatório para tais patógenos oportunistas (Bodey *et al.*, 1983; Gonçalves *et al.* 2007). Em estudo de Gonçalves *et al.*, 2007, foram isoladas amostras de *Enterobacter sp* e *Serratia sp* de bolsas periodontais capazes de produzir beta-lactamases de espectro estendido, incluindo CTXM e AMPC, conferindo resistência às penicilinas e cefalosporinas, a exceção de Ceftriaxone e Cefepime. Uma cepa de *E. cloacae* mostrou resistência inclusive à cefepime, sendo preditivo da produção de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL).

As Enterobactérias estão envolvidas em grande diversidade de quadros clínicos intestinais e extra-intestinais e, junto com os bastonetes Gram-negativos não fermentadores, são responsáveis por aproximadamente 50% das infecções de natureza nosocomial, incluindo pneumonias (Barsic *et al.*, 1997, Paju & Scannapieco, 2007).

Pneumonias associadas ao uso de ventilação mecânica

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) é uma infecção pulmonar de natureza nosocomial que incide em pacientes mantidos sob ventilação mecânica, para os quais a infecção não é a razão para o estabelecimento do suporte ventilatório. O diagnóstico de PAVM segue critérios clínicos e laboratoriais, incluindo imagens (Klompas *et al.*, 2012, Center for Disease Control (CDC)). As PAVM normalmente desenvolvem-se com infiltrado pulmonar novo ou progressivo, associado à febre, leucocitose e secreção traqueobrônquica purulenta. A pneumonia é considerada associada à ventilação se o paciente estiver intubado e em ventilação por ocasião do diagnóstico ou nas 48 horas antecedentes ao início do quadro infeccioso. As PAVM constituem causa principal de óbito entre os pacientes mantidos sob ventilação mecânica e em algumas situações as taxas de mortalidade excedem àquelas relativas às infecções em cateter central, sepsis e infecções respiratórias em pacientes não intubados, relevando a alta mortalidade dos quadros em pacientes sob terapia intensiva: 46% nos pacientes ventilados que desenvolvem PAVM, enquanto os pacientes ventilados que não desenvolvem PAVM, a taxa de mortalidade é de 32% (Ibrahim *et al.*, 2001).

Estudo Recente (Thakuria et al., 2013) mostrou que os bastonetes Gram-negativos emergiram como agentes etiológicos nas PAVM. Da mesma forma os antimicrobianos carbapenêmicos também foram utilizados nos pacientes internados nas UTI. Dentre os bastonetes entéricos Gram-negativos, *Citrobacter sp* e *Klebsiella pneumoniae* representaram, respectivamente, 52.83% e 13.21% dos organismos isolados; 48% dos organismos foram produtores de carbapenemase, sendo sensíveis à polimixina B (94%) e Tigeciclina (96%). Todos os microrganismos Gram-positivos isolados foram sensíveis (100% de sensibilidade) à vancomicina, linezolida, teicoplanina e tigeciclina.

Existe, entretanto, variabilidade quanto ao isolamento dos microrganismos envolvidos no desenvolvimento de PAVM, encontrando-se organismos da microbiota do paciente (*Haemophilus influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA)) e aqueles de circulação nosocomial, incluindo *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC), *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa*. Em estudo de Quartin et al., (2013) ocorreu predomínio de organismos Gram-positivos (72.8%). MRSA correspondeu a 42.7% dos isolados Gram-positivos, subsequente ao isolamento de MSSA (17.7%) e *Streptococcus pneumoniae* (2.5%). Os microrganismos Gram-negativos corresponderam a 36.6% dos isolados; *P. aeruginosa*, *Acinetobacter sp* e *Klebsiella sp* foram os principais patógenos do grupo, correspondendo a 9.4%, 7.3% e 6.8% dos microrganismos isolados, respectivamente.

O reconhecimento da importância do papel desses patógenos e seu potencial de colonização da cavidade bucal e seu impacto na saúde dos pacientes gerou um pleito da classe odontológica no sentido de uma atuação mais direta que possibilitasse um controle mais assistido da microbiota bucal nos pacientes hospitalizados. Desta forma, o Senado Federal aprovou em 02 de outubro de 2013, por unanimidade, na Comissão de Assuntos Sociais (CAS) o Projeto de Lei 34/2013, que estabelece a obrigatoriedade da presença de Cirurgião-Dentista em todas as Unidades de Terapia Intensiva, em hospitais públicos e privados. O referido Projeto de Lei torna obrigatória também a prestação de assistência odontológica a pacientes em regime de internação hospitalar, aos portadores de doenças crônicas e, ainda, aos atendidos em regime domiciliar na modalidade *home care* (www.senado.gov.br/atividade/materia/detalhes) Assim, observamos a inserção de um novo profissional na assistência à saúde dos pacientes hospitalizados, em uma área de atuação antes e mundialmente exercida pelos profissionais de Enfermagem, que, entretanto, pelas peculiaridades e dificuldades na abordagem da cavidade oral, tem sido exercida muito timidamente e, às vezes, até negligenciada por estes profissionais. A nascente Odontologia

Hospitalar, no âmbito da assistência à saúde dos pacientes hospitalizados ou em estados de fragilidade, poderá trazer um grande impacto na prevenção de complicações sistêmicas associadas à microbiota bucal daqueles pacientes.

Métodos de cultivo e métodos moleculares para a identificação microbiana

A identificação bioquímica microbiana em situações onde a microbiota é diversa, tal como no intestino e cavidade oral, torna difícil a determinação das espécies majoritárias e minoritárias do sítio analisado, tendo em vista a demanda de material e tempo para o isolamento e identificação de diversas colônias a partir do plantio primário. Além disso, é possível isolar a microbiota cultivável, isto é, espécies que não são capazes de crescer em meios de cultivo suplementado para o crescimento específico (seletivo) ou incubação em atmosferas adequadas de anaerobiose ou microaerofilia (ambiente com 0,5% O₂), podem influenciar negativamente o crescimento microbiano, gerando resultados falso-negativos. De modo a contornar o problema, diversos métodos moleculares são capazes de identificar os microrganismos de determinado sítio anatômico, seja direcionado à detecção de determinados microrganismos utilizando iniciadores específicos através de reações de amplificação em cadeia da polimerase (PCR), utilização de sondas genômicas para uma gama de microrganismos (*Checkerboard* para hibridização DNA-DNA). A técnica de amplificação de região conservada do RNA ribossomal 16S (gene *rrs*), seguida da eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) tem sido uma ferramenta importante para a determinação de comunidades bacterianas tendo sido proposta por Muyzer et al. (1993) e permite que produtos da PCR de mesmo tamanho, mas com diferentes sequências, possam ser separados em um gel gradiente de desnaturação crescente de formamida. Os fragmentos de DNA com diferentes sequências são separados de acordo com os domínios de GC (Guanina e Citosina). A técnica tem sido utilizada para a determinação de comunidades microbiana em solos (MacNaughton et al., 1999), na determinação de microbioma intestinal humano e animal (Mohammadzadeh et al., 2013; Remely et al., 2013; Matijašić et al., 2013), além da determinação da microbiota do sistema de canais radiculares (Siqueira *et al.*, 2000; Siqueira & Rôças, 2003; Siqueira, Rôças & Rosado, 2004; 2005; Siqueira & Rôças, 2005; Machado de Oliveira *et al.*, 2007; Sakamoto *et al.*, 2009). Sendo assim, é uma metodologia importante para facilitar a determinação da microbiota de sítios submetidos ao tratamento com soluções antimicrobianas,

apresentando maior sensibilidade do que os métodos baseados no cultivo microbiano (Munson *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2011., Siqueira, 2011). Quando aliado à amplificação em tempo real (q-PCR) é possível mensurar a amplificação gerada pelos iniciadores, quantificando o padrão de amplificação.

Efeito de cuidados de higiene bucal sobre as infecções do trato respiratório inferior

Os cuidados com a saúde bucal na prevenção de pneumonias foram evidenciados em estudo longitudinal de dois anos em pacientes idosos, onde se ressaltaram os cuidados com escovação realizada por enfermeiros após cada refeição e atendimento por um cirurgião dentista para a remoção de biofilme bacteriano e cálculo dental semanalmente. Em comparação ao grupo controle (19%), o grupo experimental (11%) apresentou menor incidência de pneumonia $p<0.05$. Além disso, o grupo experimental apresentou menor taxa de mortalidade associada à pneumonia $p<0.01$ (Yoneyama, 2002).

Diversos estudos evidenciaram redução das PAVM com utilização de soluções antissépticas tais como iodo povidona (Yoneyama, 2002) e gluconato de clorexidina a 0,2% (DeRiso *et al.*, 1996). Além disso, uma meta-análise foi publicada creditando as reduções das PAVM ao uso de soluções de clorexidina utilizadas na cavidade oral. Foi observado que nove investigações mostraram a eficácia de soluções 0.12% de clorexidina, enquanto três estudos mostraram redução das PAVM quando da utilização de clorexidina a 0.2% (Zhang *et al.*, 2013).

Acreditamos, entretanto que outros procedimentos, além da administração do antisséptico a base de clorexidina na cavidade oral, seriam adjuvantes à prevenção das PAVM tais como a elevação da cabeceira do paciente entre 30 a 45°, interrupção da sedação e aspiração das secreções subglóticas, conforme estabelecido anteriormente (ANVISA, 2009), além do tratamento de lesões na cavidade oral tais como úlceras causadas por trauma, candidíase oral, entre outras apresentações clínicas que os cirurgiões dentistas estão habitualmente aptos a diagnosticar e intervir com tratamentos específicos. Os cuidados relacionados à higiene bucal constam de várias instruções para a prevenção de PAVM, entretanto não há uma metodologia estabelecida universalmente para a realização dos procedimentos de higienização da cavidade bucal dos pacientes internados, tampouco das soluções antissépticas passíveis de utilização pelas equipes especializadas no cuidado aos

pacientes internados em UTIs. Apesar dos estudos indicarem que as soluções de clorexidina favorecem a redução das PAVM, também não ficou estabelecido se as soluções antissépticas empregadas têm a capacidade de interferir com a colonização dos patógenos respiratórios na cavidade bucal dos pacientes mantidos em terapia intensiva.

1 OBJETIVOS

Conforme explicitado, a melhoria da higiene bucal pode ser capaz de reduzir a colonização da cavidade bucal por patógenos respiratórios, especialmente nos pacientes que necessitam de cuidados de terapia intensiva.

Assim, esse trabalho tem por objetivo principal, avaliar um protocolo de higiene bucal em pacientes internados em unidades de terapia intensiva sob uso de ventilação assistida, visando a redução das taxas de infecção e mortalidade atribuída às pneumonias associadas ao uso de ventilação mecânica. Os seguintes objetivos específicos foram realizados durante a execução do projeto:

- Descrever e avaliar os efeitos do protocolo de higiene oral para pacientes internados na UTI do Hospital Central da Aeronáutica (HCA-RJ).
- Comparar as taxas de pneumonias relacionadas ao uso de ventiladores antes e após a aplicação dos procedimentos;
- Avaliar a aceitação dos procedimentos realizados pelos profissionais de odontologia pelo staff da UTI do HCA, através de questionário.
- Analisar a microbiota da mucosa bucal dos pacientes internados na UTI antes e após a introdução dos cuidados de higiene bucal, com aplicação de solução a 0,12% de digluconato de clorexidina.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Dados relativos às pneumonias por utilização de ventilação mecânica

Os dados retrospectivos relacionados às pneumonias por uso de ventilação mecânica antes e após a introdução dos procedimentos de higienização bucal dos pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Central da Aeronáutica (Ministério da Defesa – COMAER) foram obtidos a partir da base de dados, com permissão da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH/HCA), segundo critérios adotados do NNISS (Richards *et al.*, 1999). A UTI do HCA possui 9 leitos com capacidade para receber pacientes adultos crônicos e pacientes pós-operatórios encaminhados de especialidades em cabeça e pescoço, otorrinolaringologia, urologia e de cirurgia geral. Foram comparadas as taxas de pneumonia e a densidade de utilização de ventilação mecânica, antes e após a introdução dos procedimentos de higiene oral.

2.2 Descrição do protocolo de higiene oral

Em abril de 2010 os cirurgiões dentistas foram inseridos nas UTIs dos hospitais da Força Aérea Brasileira visando um melhor atendimento aos pacientes internados, em atenção à instrução normativa 005 da DIRSA de 25 de Abril de 2008. A partir de abril de 2010, todos os pacientes da UTI do HCA receberam cuidados orais diários administrados por um oficial dentista da Força Aérea Brasileira. É norma do HCA promover a higienização da cavidade bucal de todos pacientes mantidos sob internação na UTI, independente da utilização de ventilação mecânica.

Os seguintes cuidados orais foram realizados duas vezes ao dia: 1- Aspiração das secreções orais e subglóticas, 2- Exame clínico do estado geral e oral dos pacientes e das condições sistêmicas, 3- Exame oral físico direcionado às áreas de sangramento, tonalidade das membranas mucosas, presença de úlceras (em especial as de contato com os tubos e úlceras com pseudomembranas sugestivas de candidíase), presença de dentes e de mobilidade dentária sugestiva de periodontite, quantidade de saliva produzida, halitose, trauma e acúmulo

de biofilme nos tubos orotraqueais e nas superfícies dentárias, 4- coleta de esfregaço para citopatologia quando necessária, 5- alívio da dor e adequação do ambiente oral e 6- preparo dos planos para o tratamento da cavidade oral em acordo com os médicos intensivistas.

O protocolo de atendimento compreendeu as seguintes medidas: 1- informação aos pacientes ou familiares de que os procedimentos de higiene oral seriam realizados; 2- manutenção da elevação da cabeceira do paciente em 30° a 45°; 3- aspiração das secreções da boca e orofaringe com remoção de debris e crostas presentes na mucosa oral e lábios com solução enzimática: solução de lavagem não alcoólica contendo lactoperoxidase, glicose-oxidase, lisozima e lactoferrina; 4- debridamento mecânico com gaze da saburra lingual e dos tubos orotraqueais com solução enzimática; 5- remoção dos biofilmes das superfícies dentárias com escova de dentes macia, acompanhado de dentifrício não espumante; 6- remoção do dentifrício da cavidade oral com solução salina estéril e aspiração; 7- aplicação de gel umectante ou manteiga de cacau nos lábios; 8- higienização das prótese dos pacientes conscientes e imersão em solução de clorexidina a 0,12%; 9- remoção das próteses totais dos pacientes inconscientes submetidos à ventilação mecânica e utilizando tubos nasogástricos. Ao final dos procedimentos foi realizada uma lavagem final com solução de clorexidina a 0,12%, com o intuito de manter a higienização oral entre os intervalos dos procedimentos.

2.3 Aceitação dos procedimentos realizados nas UTI por cirurgiões dentistas através da aplicação de questionário

Um total de seis questões assertivas (Apêndice 1), que compreenderam percepções do *staff* da UTI acerca da atividade dos cirurgiões dentistas, foram passados a 30 profissionais que desenvolveram atividades na unidade durante o período de estudo. O questionário foi administrado apenas aos profissionais que assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, confirmando a sua participação no estudo. O questionário foi administrado cerca de 1 semana após a obtenção do último TCLE assinado e foi mantido sem identificação.

2.4 Seleção dos pacientes para coleta de material

Foi levado em consideração, no presente estudo, o material colhido de vinte pacientes (média de idade de 76 anos, 60% gênero feminino, com várias co-morbidades relacionadas à idade) internados na UTI do HCA, para a contagem de microrganismos totais e para o processamento para a identificação pelo DGGE. A coleta de material da mucosa bucal dos pacientes foi realizada através da utilização de *swab* de algodão estéril, passado por duas vezes na mucosa bucal de ambos os lados da cavidade oral dos pacientes. A seguir o *swab* foi cortado com tesoura e introduzido em tubos de ensaio 13mm x 100mm com tampa de rosca, contendo 2 mL de solução salina tamponada (PBS - 0.01M pH, 7.2) estéril e levados ao Laboratório de Difteria e Corinebactérias de Importância Clínica, para a obtenção da contagem de microrganismos totais, utilizando como meios (todos provenientes da Difco Laboratories Detroit – MI): 1- Agar sangue (Base de Agar Sangue contendo 5% de sangue desfibrinado de carneiro), 2- Agar mitis-salivarius (para a obtenção da contagem de estreptococos orais totais), 3- Agar Chapman (manitol salgado - para a contagem de estafilococos), 4- Agar McConkey (para a contagem de enterobactérias e bastonetes Gram-negativos não fermentadores) e 5- Agar Chocolate-Telurito para a contagem de bastonetes Gram-positivos. Após a semeadura os meios foram incubados em aerobiose em temperatura de $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

As coletas foram procedidas antes e após quatro dias da instituição dos procedimentos de higiene oral com a utilização de antisséptico a base de clorexidina 0,12%. As coletas foram realizadas apenas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) pelo paciente ou pelo responsável, concordando com a sua participação na investigação.

2.5 Extração e quantificação do DNA no extrato

As amostras mantidas em freezer a -80°C foram descongeladas ($37^\circ\text{C}/2$ min) e o DNA extraído com o sistema Purelink genomic DNA kit (Life Tech. USA). O material final obtido da coluna de extração em água deionizada estéril (milliQ) foi aferido em espectrofotômetro Nanovue plus spectrophotometer (GE Healthcare). Após a dosagem, os eluatos foram guardados em freezer -80°C e descongelados no momento da reação de amplificação.

2.6 Amplificação pelo PCR e análise pelo DGGE

Alíquotas de 5 ng de DNA extraído foram utilizadas para a amplificação de regiões do DNA cromossomal codificador da região do 16S rRNA (gene *rrs*) pela reação de PCR utilizando-se os iniciadores universais 968f (5'-AAC GCG AAG AAC CTTAC-3'), contendo um grampo GC (5`CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGGG-3') em sua extremidade 5' e 1401r (5`-CGG TGT GTA CAA GAC CC-3') (Nubel *et al.*, 1996). A reação da PCR foi realizada separadamente para cada um dos pares de iniciadores contendo 5µL de DNA extraído das amostras clínicas; 25 pmol de cada *primer*; 5 µl de tampão 10X para PCR; 3,8 mM de MgCl₂; 2,5 U de *Taq* DNA polimerase; 0,2 mM de cada desoxirribonucleosídeo trifosfatado e água milliQ estéril qsp para um volume final 50µL. A amplificação foi realizada em termociclador através de uma reação de desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento dos iniciadores a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese pelo gradiente de desnaturação usando o *Dcode Universal Mutation Detection System* (Bio-Rad Dcode, Richmond, VA, EUA) em 75 V e a 60°C por 16 horas em solução tampão de 1 X (20mM Tris acetato – pH 7,4, 10mM de acetato de sódio, 0,5 mM de EDTA sódico). Os produtos de PCR (30µl) foram aplicados em cada canaleta do gel de poli-acrilamida a 6% contendo gradientes de desnaturação de 40% a 70% (100% de solução desnaturante correspondente a 7M de uréia e 40% (v/v) de formamida), aumentando no sentido da eletroforese. Após a eletroforese, os géis foram corados com SYBR green I (Molecular Probes, Lieden, The Netherlands) por 40 minutos e depois escaneados usando um equipamento “Storm PhosphorImager” (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). A estrutura das comunidades bacterianas foi avaliada com base no perfil de fragmentos de DNA do gel de DGGE, com o auxílio do programa BioNumerics 6.5 (Applied Maths NV, Austin EUA). O perfil das bandas foi transformado em matrizes quantitativas, que serviram de base para as demais análises estatísticas. A ordenação multidimensional não métrica (NMS) foi feita com a utilização do programa PC-ORD 5.32 (McCune & Mefford, 2006) e a determinação dos indicadores de diversidade, com o auxílio do programa Past V2.04 (Hammer, Harper & Ryan, 2001).

2.7 Reação de amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (*rrs*) por PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real foram realizados em placas de polipropileno (96 poços) utilizando-se o sistema de detecção ABI Prism 7500 (Applied Biosystems), para quantificação da abundância total do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (*rrs*), conforme as instruções do fabricante. A reação de amplificação foi feita em um volume de 20 µL contendo 10 µL de GoTaq®qPCR Master Mix 2x (Promega), 200nM de cada iniciador, 2 µL de DNA e H₂O qsp e. As sequências foram amplificadas utilizando-se o par de iniciadores 357F [5' - CTA CGG GRS GCA G - 3'] e 529R [5' - CGC GGC TGC TGG CAG - 3'] (modificado a partir Muyzer et al, 1993). Todas as amplificações foram feitas em triplicata. Foram incluídas amostras de DNA-padrão (a partir de um clone contendo o gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal) que foram previamente utilizadas para a construção da curva padrão, e água como controle negativo. As condições de PCR foram 94 °C por 3 min, seguido de 30-40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 55 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 45 seg .

Para todas as reações, após a amplificação, foi obtida uma curva de desnaturação pelo aquecimento dos produtos a 95°C, resfriamento a 65°C e então aquecendo gradualmente até 95°C numa taxa de 0,2°C por segundo. A especificidade dos produtos gerados pela reação em tempo real foi confirmada através da análise da curva de desnaturação e verificação em gel de agarose 1,2% (Muyzer et al., 1993).

2.8 Análise estatística

As taxas de PAVM foram comparadas anualmente antes e após o início das atividades dos dentistas na UTI, através de teste ANOVA com comparações múltiplas de Tukey, através do programa GraphPad Prism 5.0. As respostas ao questionário foram representadas em percentual, obtidas após as respostas pelo *staff* dos profissionais da UTI.

2.9 Aspectos éticos

O protocolo de estudo (Anexo 1) foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (Nº 3125/2011 – CAAE 0265.0.228.000-11).

3 RESULTADOS:

3.1 Efeito dos cuidados de higiene bucal sobre as taxas de PAVM

Os procedimentos executados pelos cirurgiões-dentistas foram capazes de promover a redução da incidência das pneumonias associadas à ventilação mecânica, em paralelo com outros procedimentos desenvolvidos pelos outros profissionais que atuam na Unidade de Terapia Intensiva, reduzindo a taxa de utilização da ventilação mecânica ($p < 0.05$), especialmente no primeiro ano (2011-2012) após a aplicação dos cuidados de higiene oral. Apesar de ter ocorrido redução da utilização de ventilação mecânica no período entre 2011-2012, ocorreu retorno à densidade de utilização de ventilação mecânica durante o período de 2012-2013 ($p > 0.05$) aos níveis observados antes da introdução das atividades dos dentistas na UTI. A taxa de PAVM foi reduzida de 25.08 ± 2.855 por 1000 dias de utilização da ventilação mecânica no ano em que os dentistas foram admitidos na UTI (2010-2011) para 13.45 ± 2.395 no primeiro ano após o estabelecimento dos cuidados bucais (2011-2012, $p < 0.05$), e se manteve sem diferença estatisticamente significativa, mas com tendência à redução (10.90 ± 2.694 , $p > 0.05$) no período 2012-2013. É importante destacar que durante o segundo ano a taxa de utilização da ventilação mecânica não foi significativamente diferente dos anos que precederam a admissão dos cirurgiões dentistas na UTI (Figura 1).

3.2 Opinião dos Profissionais da Equipe da UTI com relação aos procedimentos de cuidados orais

Após o estabelecimento dos procedimentos de cuidados bucais/orais, alguns dos profissionais, especialmente os médicos intensivistas e os fisioterapeutas, forneceram aos dentistas informações com relação às modificações quanto ao odor do ambiente da UTI, quanto à halitose e secreções bucais produzidas pelos pacientes. Estas percepções foram utilizadas para produzir o questionário apresentado na **Tabela 1**. Um total de 08 médicos, 08 enfermeiros, 04 fisioterapeutas, 06 auxiliares de enfermagem e 04 outros profissionais vinculados à assistência à saúde e pertencentes à equipe do UTI responderam ao questionário.

O tempo médio de experiência profissional foi estimado em 137,73 meses. A oferta de procedimentos de higiene oral aos pacientes do UTI foi considerada como um fator positivo por 96,66% (29/30) dos profissionais (somatório das respostas forte e muito forte). A mudança do odor da cavidade oral dos pacientes foi notada por 93,33% (28/30) dos profissionais. A melhora do odor do ambiente da UTI após a instituição dos cuidados bucais

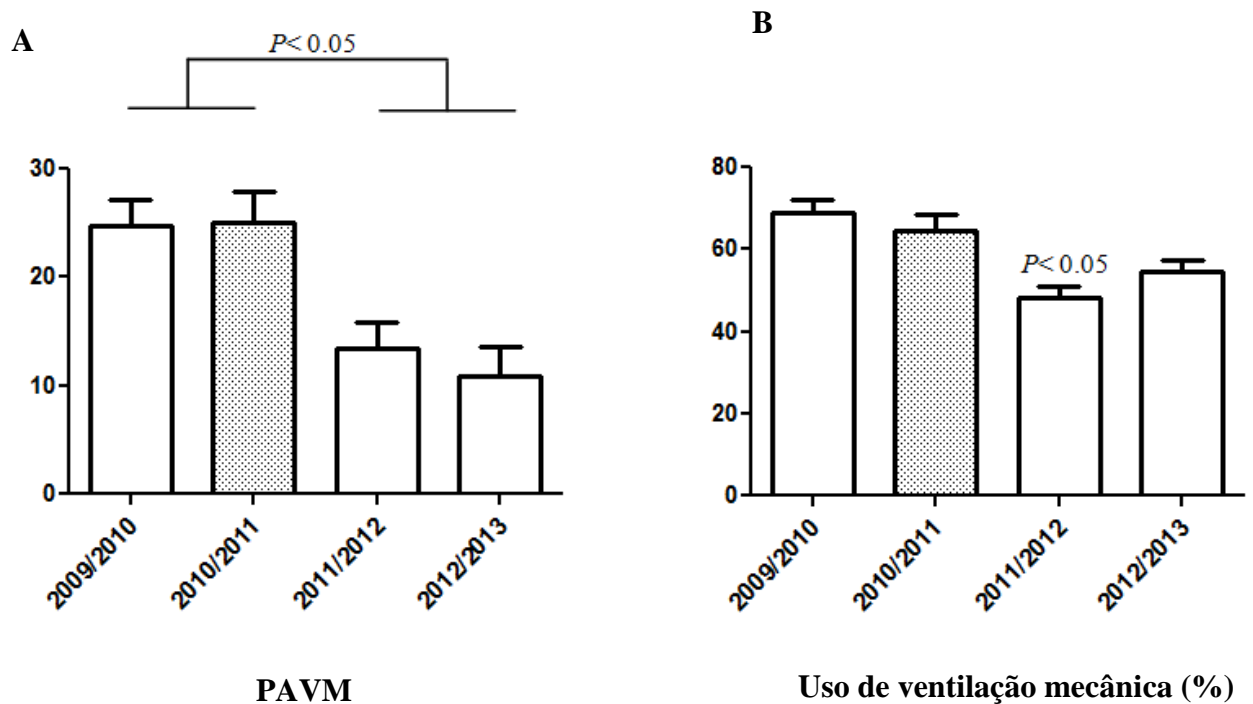


Figura 1 - **A**- Incidência de pneumonia associada à ventilação mecânica por 1000 dias de ventilação mecânica durante o período de estudo. **B**- Densidade de utilização de ventilação mecânica durante o período de estudo (%). ▨ Ano em que os cirurgiões-dentistas foram admitidos na UTI

Tabela 1- Questionário aplicado aos profissionais em atuação na UTI e os percentuais das repostas às questões assertivas.

Questões	Opções assertivas	% de respostas às questões
Q1: Você considera oferecer cuidados em saúde bucal aos pacientes um fator diferencial no âmbito do atendimento em Terapia Intensiva?	1- Muito forte; 2- Forte; 3- Médio; 4- Fraco 5- Não respondida	1- 73.33% 2- 23.33% 3- 0% 4- 0% 5- 3.33%
Q2: Você percebeu alguma alteração com relação ao ODOR do PACIENTE (HALITOSE) após a implantação dos cuidados de higiene bucal?	1- Sim 2- Não 3- Não Observado 4- Não Respondida	1- 93.33% 2- 3.33% 3- 3.33% 4- 0%
Q3: Você percebeu alguma alteração com relação ao ODOR do AMBIENTE do CTI após a implantação dos cuidados de higiene bucal?	1- Sim 2- Não 3- Não Observado 4- Não Respondida	1- 60% 2- 20% 3- 20% 4- 0%
Q4: Você observou redução na presença de ÚLCERAS ou FERIDAS BUCAIS/LABIAIS durante o tempo de internação dos pacientes após a instituição dos cuidados de higiene bucal?	1- Sim 2- Não 3- Não Observado 4- Não Respondida	1- 80% 2- 0% 3- 20% 4- 0%
Q5: Você observou redução na ocorrência das secreções nasais e bucais após a implantação dos cuidados de higiene bucal?	1- Sim 2- Não 3- Não sei 4- Não respondida	1- 70% 2- 10% 3- 20% 4- 0%
Q6: Houve melhoria das condições do atendimento ao paciente (i.e., a realização dos procedimentos de atenção direta se tornou mais agradável) após a implantação dos cuidados de higiene bucal?	1- Sim 2- Não 3- Não sei 4- Não respondida	1- 86.66% 2- 3.33% 3- 10% 4- 0%

foi percebida por 60% (18/30) do *staff*.

A redução das úlceras orais e labiais durante o período de internação dos pacientes foi observada por 80% da equipe. Foi observada a redução da produção de secreções orais e nasais após o estabelecimento dos procedimentos de higiene oral por 70% dos profissionais da UTI. De uma forma geral os procedimentos realizados nos pacientes se tornaram mais agradáveis de serem executados após a instituição dos cuidados bucais para 86.66% dos componentes do *staff*. Baseado nas respostas obtidas após a análise do questionário a atuação dos cirurgiões dentistas na referida UTI melhorou a saúde bucal dos pacientes internados e trouxe um incremento à assistência aos pacientes de uma forma geral.

3.3 Contagem de micro-organismos aeróbios/facultativos da mucosa bucal dos pacientes internados na UTI

A **Tabela 2** mostra os valores da contagem total dos micro-organismos aeróbios viáveis antes e quatro dias após o início da realização dos procedimentos de higienização da cavidade oral com utilização de antisséptico contendo 0,12% de gluconato de clorexidina. Ocorreu a redução da contagem do número total de micro-organismos viáveis em 10 pacientes (50%) e aumento da contagem do número total de micro-organismos em 08 (40%) dos vinte pacientes em que foram realizadas as coletas para a realização do DGGE e a contagem de organismos totais aeróbios. Em dois pacientes (26 e 31) a contagem de micro-organismos totais manteve-se igual ou os organismos não foram detectados.

Seis pacientes foram colonizados por bastonetes Gram-negativos após o estabelecimento dos procedimentos de higiene oral com a utilização da solução de clorexidina a 0,12%. Tal grupo foi responsável pelo aumento do número total de micro-organismos cultiváveis na segunda coleta, exceto para a amostragem do paciente 13, onde ocorreu redução na contagem de micro-organismos totais aeróbios, com colonização por bastonetes Gram-negativos. Ocorreu aumento da contagem de bastonetes Gram-negativos com redução da contagem total dos organismos aeróbios apenas para o paciente 34. A redução/controle dos bastonetes Gram-negativos pela utilização dos procedimentos de higiene oral ocorreu apenas para três pacientes.

A colonização da mucosa bucal por estafilococos (crescimento em meio de Chapman) também ocorreu após a instituição dos procedimentos de higiene oral com utilização de clorexidina a 0,12% para cinco pacientes. Em apenas um paciente previamente colonizado, ocorreu aumento da contagem de estafilococos após os procedimentos de higienização da

cavidade oral. A redução da contagem dos estafilococos foi observada em seis pacientes, um deles reduzindo para níveis não detectáveis (paciente 7).

O aumento nas contagens dos bastonetes Gram-positivos foi observado para oito pacientes (crescimento em ACT). Devido ao fato de alguns membros dos estafilococos poderem crescer em meio Chapman e em Agar chocolate telurito, a reação de Gram foi realizada de modo a se ter certeza de que o crescimento não se tratava de membros do gênero *Staphylococcus*. Apenas na amostra do paciente 1 ocorreu aumento concomitante de estafilococos e bastonetes Gram-positivos observado pela coloração de Gram, como sendo tanto por cocos como bastonetes Gram-positivos. Na maior parte dos pacientes em que houve detecção de bastonetes Gram-positivos, ocorreu redução de estafilococos. Em treze pacientes, ocorreu aumento ou manutenção das contagens de Bastonetes Gram-positivos após a realização dos procedimentos de higiene com utilização de clorexidina a 0,12%.

Com relação à contagem de estreptococos orais (crescimento em agar mitis-salivarius), foi observado o crescimento de bastonetes Gram-negativos (pela coloração de Gram), que refletiu no aumento concomitante das contagens observadas nos meios McConkey e Agar mitis-salivarius. Destarte, o crescimento em Agar mitis-salivarius não garantiu a seletividade para o gênero *Streptococcus sp* de cavidade oral.

3.4 Identificação das espécies pelo DGGE

A **Tabela 3** mostra as espécies/gêneros identificados pela técnica de DGGE, após a amplificação do DNA extraído e sequenciamento dos produtos de amplificação (amplicons). Foi possível confirmar o crescimento dos bastonetes Gram-negativos (Agar MCK) para algumas amostras, entretanto a técnica não permitiu a identificação/sequenciamento das cepas bacterianas presentes nas amostras dos pacientes de números 11, 26, 28, 29 e 30.

Houve divergência entre os resultados obtidos da contagem de micro-organismos totais utilizando meios seletivos diversos e o padrão de amplificação pelo PCR. Em todas as circunstâncias em que foram detectados micro-organismos no meio Chapman, que permite o crescimento dos estafilococos e em menor grau de enterococos, apenas no material do paciente 25 foi detectada a espécie *S. epidermidis*. Assim o processo de colonização por *Staphylococcus sp* e ou *Enterococcus sp* observado anteriormente não pode ser confirmada em nível de espécie através do DGGE. Entretanto, em algumas oportunidades ocorreu confirmação de muitos dos achados das contagens, tais como a ausência de detecção do *Enterobacter sp* da segunda coleta do paciente 2, a confirmação de *Enterobacter sp* nas amostras 7 A e 7 B, de *Klebsiella pneumoniae* apenas na amostra 24B e 20B, de

Tabela 2 - Contagem de micro-organismos aeróbios viáveis no início (A) e após quatro dias (B) de aplicação dos procedimentos de higiene oral. AS- Contagem de totais; ACT- Contagem de bastonetes Gram-positivos irregulares; MS- Contagem de estreptococos orais; MCK- Contagem de Bastonetes Gram-negativos; CHA- Contagem de estafilococos/enterococos.

Coletas	AS*	ACT	MS	MCK	CHA
1A	$2,08 \times 10^6$	0	$1,06 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	0
1B	$1,8 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$	4×10^5
2A	8×10^5	$0,82 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	1×10^5	3×10^5
2B	$1,18 \times 10^5$	$0,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	0	5×10^5
7A	$7,7 \times 10^7$	0	$5,7 \times 10^7$	$2,53 \times 10^5$	$1,43 \times 10^6$
7B	$1,36 \times 10^6$	$7,9 \times 10^3$	$1,33 \times 10^4$	$8,66 \times 10^5$	0
8A	6×10^4	0	5×10^4	0	0
8B	5×10^6	$1,3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	9×10^5	$1,13 \times 10^5$
11A	$5,7 \times 10^5$	4×10^5	$7,3 \times 10^4$	0	0
11B	$1,66 \times 10^5$	$2,53 \times 10^5$	$2,33 \times 10^4$	0	$1,53 \times 10^5$
12A	$1,9 \times 10^6$	$5,33 \times 10^5$	$4,43 \times 10^5$	0	5×10^4
12B	$5,3 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	0	0	$2,3 \times 10^5$
13A	1×10^6	0	0	0	0
13B	8×10^5	2×10^4	0	$2,33 \times 10^5$	0
16A	$4,66 \times 10^6$	0	$2,33 \times 10^5$	0	0
16B	5×10^6	7×10^4	$1,5 \times 10^6$	$1,36 \times 10^5$	0
18A	$6,33 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$5,66 \times 10^6$	$3,33 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$
18B	$1,9 \times 10^5$	$6,33 \times 10^4$	0	$8,66 \times 10^5$	$2,33 \times 10^4$
20A	$2,8 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$	0	0
20B	$1,53 \times 10^6$	$1,1 \times 10^5$	$6,33 \times 10^5$	$> 10^7$	$1,5 \times 10^6$
21A	5×10^4	$3,66 \times 10^4$	0	0	0
21B	$7,06 \times 10^7$	$1,33 \times 10^3$	$6,13 \times 10^7$	$6,13 \times 10^7$	0
24A	$2,4 \times 10^4$	0	$1,73 \times 10^4$	0	0
24B	$1,3 \times 10^7$	$3,66 \times 10^3$	$1,03 \times 10^7$	$1,13 \times 10^7$	0
25A	$2,03 \times 10^5$	$6,66 \times 10^4$	$1,8 \times 10^5$	0	$1,93 \times 10^5$
25B	4×10^4	$5,66 \times 10^3$	$2,66 \times 10^4$	0	3×10^4
26A	0	0	0	0	$1,66 \times 10^2$
26B	0	0	0	0	0
28A	7×10^3	$6,66 \times 10^3$	0	0	0
28B	$2,6 \times 10^8$	$7,66 \times 10^5$	$1,5 \times 10^8$	$1,46 \times 10^8$	$2,33 \times 10^4$
29A	$4,5 \times 10^8$	$5,33 \times 10^5$	4×10^8	4×10^8	0
29B	$\sim 10^9$	7×10^5	$\sim \times 10^9$	$1,76 \times 10^8$	0
30A	$7,33 \times 10^6$	$4,33 \times 10^3$	$5,33 \times 10^6$	0	0
30B	7×10^5	$1,43 \times 10^5$	5×10^5	0	0
31A	5×10^8	$1,03 \times 10^4$	4×10^8	4×10^8	0
31B	5×10^8	45×10^3	5×10^8	5×10^8	0
33A	$3,66 \times 10^7$	$6,66 \times 10^6$	$1,266 \times 10^6$	7×10^5	5×10^5
33B	$1,5 \times 10^8$	$4,66 \times 10^4$	$1,53 \times 10^8$	$1,4 \times 10^8$	$1,4 \times 10^5$
34A	$4,66 \times 10^7$	$4,66 \times 10^6$	4×10^6	$4,13 \times 10^5$	$8,33 \times 10^6$
34B	$5,66 \times 10^5$	7×10^5	3×10^4	6×10^5	$3,33 \times 10^5$

* AS: Agar sangue (contagem de totais aeróbios/facultativos), ACT: Agar chocolate telurito de potássio: seletivo para bastonetes Gram-positivos e estafilococos em algumas situações, MS: Agar mitis salivarius (crescimento de estreptococos e enterococos), MCK: Agar MacConkey permite o crescimento de bastonetes Gram-negativos não fermentadores e bastonetes entéricos, CHA: Agar Chapman ou manitol salgado, permite o crescimento de estafilococos e enterococos.

Acinetobacter baumannii na amostra 21. Tais resultados comprovaram os achados nos métodos de cultivo, confirmando a colonização da mucosa bucal por micro-organismos Gram-negativos durante a aplicação dos procedimentos com a utilização de solução de clorexidina a 0,12%.

A utilização de 0,12% clorexidina reduziu as contagens relativas ao grupo dos *Streptococcus sp* e dos *Lactococcus sp*, tendo sido tais organismos detectados apenas antes do início dos procedimentos em cinco amostras (materiais A). *Streptococcus sanguinis* foi detectado nos materiais B em 2 ocasiões. Dentre o grupo dos bastonetes Gram-positivos o grupo dos *Lactobacillus sp* foi de forma geral resistente ao agente antisséptico utilizado, mantendo-se nos materiais após a realização dos procedimentos, assim como o gênero *Corynebacterium sp*.

De modo geral, a utilização do agente antisséptico não eliminou os micro-organismos Gram-negativos da cavidade oral, incluindo os gêneros *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* e a espécie *Haemophilus influenzae*. A espécie *Pseudomonas aeruginosa*, quando foram observadas colônias nos meios seletivos, não foi identificada através do sequenciamento dos amplicons do DGGE. A técnica de DGGE foi capaz de determinar a diversidade dos amplicons entre as amostras, mostrando que ocorreu diversidade microbiana entre as coletas, indicando que a cavidade bucal alberga micro-organismos que podem apresentar resistência à concentração de clorexidina utilizada durante o procedimento de higiene da cavidade oral.

3.5 Determinação da carga microbiana das amostras de mucosa bucal através da amplificação em tempo real

Os números de cópias utilizando os iniciadores do gene *rrs* também foi determinado através de PCR em tempo real (qPCR) (**Tabela 4**). A redução do número de cópias após o estabelecimento dos procedimentos de higiene oral ocorreu em apenas sete amostras (35% dos pacientes). Ocorreu aumento no número de cópias dos genes *rrs* em 13 das amostras amplificadas (65%) após a realização dos procedimentos, aspectos diferentes do observado quando da contagem de micro-organismos totais viáveis. Foi observada correlação entre as contagens de viáveis de micro-organismos facultativos/aeróbios e a determinação dos números de cópias de amplicons pelo qPCR em nove amostras com resultado significativo

($p < 0.05$), com redução concomitante às duas técnicas para 3 amostras (2, 11 e 18) e aumento para seis amostras (16, 20, 21, 24, 28 e 33). Nas duas amostras com contagem similar (26 e 31) as variações nos números de cópias entre as duas coletas não foram

Tabela 3 - Espécies encontradas após sequenciamento dos amplicons obtidos a partir da reação de amplificação utilizando a técnica de eletroforese em gel com gradiente desnaturante- DGGE.

Coleta	Amplicons	Espécies encontradas
1 A	4	<i>Enterobacter sp.</i>
1 B	4	<i>Enterobacter sp.</i> ; <i>Lactobacillus sp.</i>
2 A	7	<i>Enterobacter sp.</i>
2 B	5	<i>Streptococcus sanguinis</i>
7 A	9	<i>S. sanguinis</i> ; <i>Lactobacillus sp.</i> ; <i>Enterobacter sp.</i>
7 B	7	<i>Lactobacillus sp.</i> ; <i>Enterobacter sp.</i>
8 A	4	<i>S. sanguinis</i>
8 B	3	<i>Lactobacillus sp.</i>
12 A	5	<i>S. sanguinis</i> ; <i>Lactobacillus sp.</i> ; <i>Enterobacter sp.</i>
12 B	4	<i>Enterobacter sp.</i>
13 A	2	<i>Corynebacterium mucifaciens</i>
13 B	4	<i>Corynebacterium sp.</i>
16 A	5	<i>Lactococcus lactis</i>
16 B	4	<i>S. sanguinis</i> ; <i>Granulicatella adjacens</i>
18 A	4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Streptococcus sp.</i>
18 B	4	<i>K. pneumoniae</i>
20 A	5	<i>Streptococcus sp.</i>
20 B	6	<i>K. pneumoniae</i>
21 A	3	<i>Acinetobacter baumannii</i>
21 B	3	<i>A. baumannii</i>
24 A	6	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>
24 B	3	<i>H. parainfluenzae</i> ; <i>K. pneumoniae</i>
25 A	7	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
25 B	6	<i>S. epidermidis</i>
31 A	4	<i>Kluyvera ascorbata</i> ; <i>Enterobacter sp.</i>
31 B	3	<i>K. ascorbata</i> ; <i>Enterobacter sp.</i>
33 A	5	<i>K. ascorbata</i>
33 B	3	<i>K. ascorbata</i>
34 A	5	<i>S. epidermidis</i> ; <i>Lactobacillus paracasei</i> ; <i>A. baumannii</i>
34 B	8	<i>L. paracasei</i> ; <i>A. baumannii</i>

Tabela 4 - Comparação entre as contagens de micro-organismos viáveis e o perfil de amplificação na reação de PCR em tempo real (qPCR), em número de cópias por amostra, no início (A) e após quatro dias (B) de aplicação dos procedimentos de higiene oral.

Coletas	Contagem de viáveis	qPCR	
		Nº de cópias X 10 ⁷	<i>p</i>
1A	2.08 x 10 ⁶	5.517 ± 1.233	0,0938 ns
1B	1.8 x 10 ⁶	49.10 ± 15.48	
2A	8 x 10 ⁵	39.03 ± 4.476	0,0172
2B	1.18 x 10 ⁵	2.083 ± 0.5860	
7A	7.7 x 10 ⁷	1.477 ± 0.2742	0,3053 ns
7B	1.36 x 10 ⁶	2.373 ± 0.3828	
8A	6 x 10 ⁴	8.210 ± 0.3926	0,0192
8B	5 x 10 ⁶	3.620 ± 0.3522	
11A	5.7 x 10 ⁵	139.0 ± 6.928	0,0025
11B	1.66 x 10 ⁵	19.80 ± 2.458	
12A	1.9 x 10 ⁶	1.517 ± 0.3563	0,0368
12B	5.3 x 10 ⁵	11.48 ± 1.890	
13A	1 x 10 ⁶	4.647 ± 0.1444	0,0298
13B	8 x 10 ⁵	17.47 ± 3.875	
16A	4.66 x 10 ⁶	2.517 ± 0.1452	0,0085
16B	5 x 10 ⁶	7.327 ± 0.9867	
18A	6.33 x 10 ⁶	14.90 ± 1.106	0,0432
18B	1.9 x 10 ⁵	7.377 ± 0.5860	
20A	2.8 x 10 ⁵	2.170 ± 0.1595	0,0040
20B	1.53 x 10 ⁶	7.700 ± 0.2540	
21A	5 x 10 ⁴	2.447 ± 0.3730	0,0456
21B	7.06 x 10 ⁷	4.137 ± 0.08373	
24A	2.4 x 10 ⁴	0.4067 ± 0.02848	0,0154
24B	1.3 x 10 ⁷	55.67 ± 6.926	
25A	2.03 x 10 ⁵	1.610 ± 0.04041	0,0009
25B	4 x 10 ⁴	5.940 ± 0.1443	
26A	0	25.97 ± 3.955	0,1588 ns
26B	0	17.20 ± 4.041	
28A	7 x 10 ³	4.453 ± 0.9850	0,0231
28B	2.6 x 10 ⁸	48.43 ± 7.332	
29A	4.5 x 10 ⁸	7.070 ± 1.129	0,0325
29B	~10 ⁹	0.8467 ± 0.04333	
30A	7.33 x 10 ⁶	0.3533 ± 0.05364	0,0060
30B	7 x 10 ⁵	2.057 ± 0.1357	
31A	5 x 10 ⁸	3.123 ± 0.3114	0,0524 ns
31B	5 x 10 ⁸	6.300 ± 0.4590	
33A	3.66 x 10 ⁷	4.157 ± 1.007	0,0183
33B	1.5 x 10 ⁸	13.15 ± 0.4330	
34A	4.66 x 10 ⁷	0.3567 ± 0.06642	0,0554 ns
34B	5.66 x 10 ⁵	4.500 ± 1.051	

ns: valores não significativos de *p*, segundo o teste *t* de student pareado.

significativas. Se forem levados em consideração todos os resultados correlatos e as duas amostras com contagens similares com resultados não significativos, ocorreu correlação em 55% das amostras. Três amostras (1, 7 e 34) não expressaram diferenças significativas entre os números de cópias amplificadas na primeira e a na segunda coleta com a aplicação dos procedimentos de higiene oral e aplicação da clorexidina. Foram obtidos resultados divergentes entre a contagem de viáveis e o padrão de amplificação pelo qPCR em nove amostras (1, 7, 8, 13, 25, 29, 30 e 34), três delas com resultados não significativos entre os padrões de amplificação antes e após a aplicação dos procedimentos de higienização oral.

3 DISCUSSÃO

A PAVM é uma das infecções hospitalares mais comumente adquiridas por pacientes submetidos à ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva e apresenta uma ocorrência que variava entre 9 a 27% de todos os pacientes intubados na Europa durante a década de 1990 (Vincent et al., 1995). Dados mais recentes mostraram que na Europa, Irã e Turquia as pneumonias correspondem a quase metade das infecções em pacientes internados em UTI (Erdem et al., 2014). Assim, tais processos infecciosos aumentam o período de internação hospitalar, reduzindo a sobrevida dos pacientes, acarretando o aumento dos custos do tratamento. Portanto, as medidas capazes de favorecer o tratamento dos pacientes mantidos sob ventilação mecânica, reduzindo os custos da internação, são naturalmente elegíveis pelas instituições envolvidas em terapia intensiva. Como observado em UTI direcionada ao tratamento de pacientes que sofreram cirurgia cardíaca, com protocolo de higiene bucal estabelecido com utilização de solução de gluconato de clorexidina a 0,12%, o protocolo estabelecido na presente investigação foi capaz de reduzir as PAVM nos dois anos seguintes à entrada dos cirurgiões dentistas na UTI do Hospital Central da Aeronáutica.

O protocolo a que todos os pacientes são submetidos foi melhorado pela equipe do HCA a partir da Ordem de Serviço 005 da DIRSA de 25 de Abril de 2008 e adaptado para as características dos pacientes adultos crônicos na rotina da UTI, a maioria deles idosos com vários tipos de co-morbidades. Conforme observado neste estudo a redução da PAVM, com o estabelecimento do protocolo de higiene oral, correspondeu a 46,37% no primeiro ano e reduziu 56,63% no segundo ano após o estabelecimento do protocolo. Estudo realizado em Instituto Neurológico em Phoenix, Estados Unidos, encontrou redução de 50,12% na incidência das PAVM, um nível semelhante ao observado na presente investigação (Prendergast et al., 2013).

O índice de ventilação mecânica também diminuiu ($p < 0,05$) após o primeiro ano (2011/2012) do estabelecimento dos procedimentos orais realizados por cirurgiões-dentistas, o que poderia estar correlacionado com a redução da PAVM. Entretanto o índice da ventilação mecânica foi reduzido de 25,46% quando comparado com aqueles dos anos anteriores, enquanto a redução da PAVM foi de 46,37%. Após o segundo ano de aplicação dos procedimentos (2012-2013), a densidade de utilização de ventilação mecânica retornou a níveis similares aos anos de 2009-2010 e 2010-2011, e também não foi diferente significativamente ao ano de 2011-2012 ($p > 0,05$) e a incidência de PAVM continuou a

diminuir significativamente, quando comparada às incidências dos anos anteriores à admissão dos cirurgiões-dentistas na UTI.

Embora a incidência das PAVM tenha reduzido significativamente após a instituição do protocolo de higiene oral, a incidência de PAVM no hospital ainda permanece elevada (10,90 por 1000 dias de ventilação mecânica) e esforços ainda são necessários para reduzir ainda mais a sua incidência. Nos Estados Unidos, a incidência média de PAVM em UTIs com o mesmo número de leitos é de 1,9 por 1000 dias de ventilação (Edwards et al., 2009). Convém ressaltar, entretanto, que a UTI onde foi desenvolvido o estudo, recebe principalmente pacientes crônicos, com média de idade de 72,6 anos (dados não apresentados), muitos deles apresentando condições de fragilidade e imuno-senectude que favorecem o agravamento das condições clínicas. Além disso, com a continuidade da utilização do protocolo de atendimento aos pacientes da UTI é provável que a incidência das PAVM reduza ainda mais ao longo do tempo.

A aplicação do questionário, consultando a opinião da equipe envolvida na UTI mostrou que o estabelecimento/oferecimento do protocolo de higiene oral para pacientes internados na Unidade foi considerado como importante por 96,66% dos profissionais (soma das respostas muito forte e forte). Entre a equipe, já havia um entendimento geral que a higiene oral poderia melhorar a qualidade de vida dos pacientes submetidos ao cuidado intensivo, reduzindo as PAVM (Berry & Davidson, 2006).

No que diz respeito às medidas de higiene oral administradas pela equipe de cirurgiões-dentistas para os pacientes da UTI, a percepção dos profissionais foi de que ocorreu redução da halitose (93,33%) e diminuição das úlceras intra-orais e labiais (80%) nos pacientes submetidos aos cuidados de terapia intensiva. Os dentistas tem a formação adequada para a realização de intervenções na cavidade oral, incluindo a eliminação de biofilmes e cálculo dentário, remoção de arestas cortantes em dentes e próteses, capazes de traumatizar língua e outros tecidos e realizar procedimentos menores tais como extração de raízes e dentes. Ressalta-se que o desenvolvimento de úlceras e estomatites aumenta o risco de translocação de patógenos (Holmstrup et al., 2003) podendo causar além das pneumonias, sepse e falência múltipla de órgãos, a partir dos sítios orais, especialmente quando colonizada por patógenos capazes de apresentar resistência múltipla aos agentes antimicrobianos, e que circulam no ambiente hospitalar. Além disso, o diagnóstico clínico apropriado de alguns tipos de lesões na cavidade oral com o auxílio de exame histopatológico por raspagem, incluindo as lesões de candidíase oral, direciona a terapia específica com a utilização de nistatina. Tais

abordagens raramente são realizadas pelos profissionais de Enfermagem, especialmente os técnicos e auxiliares, os quais não são treinados clinicamente para esta finalidade.

Embora a higiene oral seja uma prática fundamental que os profissionais de Enfermagem ofereçam aos pacientes, a prática pode ser desafiadora em função de uma diversidade de motivos. Algumas barreiras chave incluem obstáculos mecânicos tais como tubos e dispositivos de fixação de tubos endotraqueais, dificuldade de comunicação entre os profissionais e pacientes inconscientes (Feider et al., 2010). Além disso, os profissionais de Enfermagem não dispõem de instrumentos para a abordagem aos cuidados bucais em pacientes sob cuidados críticos. De fato, os profissionais de UTI requerem informações específicas (Berry & Davidson, 2006) para oferecer os procedimentos adequados aos pacientes críticos e que são oferecidos pela maioria dos cursos de graduação em Odontologia, tais como a observação e diagnóstico diferencial de úlceras na cavidade oral, tonalidade da cor da mucosa relacionada aos processos inflamatórios incluindo mucosites, remoção de arestas cortantes, tratamento de úlceras periorais/labiais relacionadas aos tubos orotraqueais, entre outras situações frequentemente observadas entre tais pacientes.

Cerca de três meses após o início dos procedimentos de higiene oral, os médicos intensivistas perceberam não apenas a redução da halitose do paciente, mas também uma redução do odor do ambiente da UTI. Além disso, os fisioterapeutas também perceberam que os pacientes se tornaram menos secretivos (secreção nasal e sinusal). Tais percepções justificaram a inclusão das perguntas de números 3 e 5 do questionário. Tais perguntas foram coincidentes às opiniões do pessoal da UTI em 60% e 70%, respectivamente. Em ambas as perguntas as respostas “não sei” corresponderam a 20% da população. Devido ao fato de ambas as perguntas terem sido formuladas após a percepção de grupos selecionados da UTI e em função do questionário ter sido aplicado de forma cega, sem a identificação do profissional que respondeu cada questionário, foi impossível a identificação dos grupos profissionais que perceberam tais efeitos. A aplicação do questionário de forma cega foi importante, pois são em número de 30 os profissionais de maior circulação na UTI e todos responderam ao questionário. Entretanto, outras investigações são necessárias para confirmar os resultados com estudos mais abrangentes envolvendo outras UTIs.

Ao contrário do que se esperava, ocorreu redução nas contagens dos micro-organismos da mucosa bucal, antes e após a aplicação dos procedimentos de higiene bucal em apenas 50% dos pacientes através da contagem de aeróbios/facultativos viáveis. Quando comparado com o padrão de amplificação através de PCR em tempo real, o percentual foi ainda menor, mesmo utilizando a solução de clorexidina a 0,12%. Tais aspectos se devem provavelmente

devido ao fato de o qPCR utilizando iniciadores para o gene *rrs* (16SrRNA) amplificar uma grande diversidade dos genes em micro-organismos que não seriam capazes de crescer nos meios de cultura utilizados. Dentre estes podemos destacar a espécie *Haemophilus parainfluenzae*, que é capaz de crescer em meios quando é fornecido o fator V (NAD) presente quando é utilizado o Agar chocolate (Gromkova & Koornhof, 1990). Assim, os meios utilizados no plaqueamento para a determinação dos micro-organismos totais cultiváveis podem não ter permitido o crescimento de parte dos micro-organismos cultiváveis, tampouco a atmosfera utilizada permitiria o cultivo de micro-organismos anaeróbios estritos. Tais razões devem ser levadas em consideração quando são realizadas comparações entre a contagem de totais viáveis e os padrões de amplificação pelo qPCR. Resultados correlatos entre a contagem e o padrão de amplificação (55% das amostras) confirmaram os valores das contagens de viáveis.

Resultados opostos entre a contagem de viáveis e o qPCR também podem ocorrer devido à detecção de amplicons de pesos moleculares diferentes para o mesmo micro-organismo. Em algumas situações ocorreu a amplificação de mais de um amplicon que, após o sequenciamento, demonstrou se tratar da mesma espécie microbiana. Assim, é possível que uma mesma espécie gere número de cópias 2 ou 3 vezes maior durante a determinação em tempo real. Isto pode gerar resultados maiores no qPCR quando comparadas à contagem tradicional. Outro aspecto a ser considerado é a possibilidade de o qPCR determinar a presença de micro-organismos não viáveis, como ocorre com as espécies do gênero *Mycobacterium* presentes no ambiente intracelular em macrófagos (Pathak et al., 2012). Durante o procedimento de coleta realizada no presente estudo, grande quantidade de células da mucosa bucal foi removida e certamente parte dos micro-organismos estavam presentes no interior celular, suscetível, portanto a mecanismos diversos de morte intracelular, mesmo sendo tais células destituídas da atividade fagocítica profissional.

Diversos estudos apontam as soluções de clorexidina como antissépticos chave na proteção contra as PAVM. Quando foi feita a opção pelo protocolo utilizando solução 0,12% de clorexidina, foram tomados por base dois estudos onde foi observada a redução da PAVM em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca (De Riso et al., 1996) e em pacientes intubados mantidos sob ventilação mecânica (Bopp et al., 2006). Estudo recente de revisão sistemática mostrou que ocorreu redução das PAVM por utilização de soluções de clorexidina a 0,12 e 0,2%; a utilização de clorexidina foi considerada o determinante da redução das PAVM em pacientes críticos (Zhang et al, 2013).

Na presente investigação foi constatado que o protocolo de higiene oral de fato reduziu o desenvolvimento das PAVM, entretanto o uso da clorexidina não eliminou os microrganismos principais responsáveis pelo estabelecimento dos quadros de PAVM (Thakuria et al., 2013; Quartin et al., 2013), apesar de alguns deles não terem sido identificados pelo DGGE. Tais resultados estão em concordância com os observados por Bellissimo-Rodrigues et al. (2009), onde não foram observadas variações das taxas de PAVM entre pacientes que receberam a higienização com a utilização de placebo ou utilização de clorexidina a 0,12%. Foi observado que os pacientes que foram tratados com solução de clorexidina apresentaram um estabelecimento mais tardio da PAVM, o que já seria favorável para os pacientes que estão mantidos por períodos de tempo mais curto na UTI. Talvez por essa razão ainda seja importante a manutenção da utilização das soluções de clorexidina nos protocolos de higiene oral desenvolvidos nas UTI, dependendo das características das diferentes unidades de terapia intensiva. É provável que em UTI de pacientes em recuperação de cirurgias cardíacas, em que a utilização de ventilação mecânica é baixa, o protocolo de higiene oral com utilização de clorexidina apresente maior eficácia na eliminação dos microrganismos de circulação hospitalar e no desenvolvimento das PAVM do que na UTI investigada neste trabalho, com pacientes crônicos e em idade mais avançada, requerendo longos períodos de ventilação mecânica.

Além disso, Berry et al., 2011 demonstraram que a higienização oral a cada duas horas, utilizando água estéril como solução de lavagem (1% dos pacientes desenvolveram PAVM) foi mais eficiente na redução das PAVM do que soluções de bicarbonato de sódio ou solução de clorexidina a 0,2% (com o desenvolvimento de PAVM em 5% dos pacientes para ambas as soluções de lavagem da cavidade oral), relevando a importância do protocolo de higiene oral e não as soluções de clorexidina na redução das PAVM.

Como observado, o protocolo utilizado também não impediu a colonização dos pacientes durante o período de internação por bastonetes Gram-negativos entéricos (*K. pneumoniae*, *Enterobacter sp.*) e não fermentadores (*Acinetobacter sp.*) detectados pelo sequenciamento das bandas do DGGE. Durante o desenvolvimento do trabalho, ocorreram situações de infecções em pacientes da UTI causadas por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase (KPC), *A. baumannii* apresentando resistência a diversos agentes antimicrobianos, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), dentre outros agentes infecciosos (dados não mostrados). Como perspectivas futuras, será importante determinar, através de técnicas de PCR convencionais, a presença de KPC e os outros patógenos que circulam no ambiente hospitalar, assim como a presença de genes de

resistência aos agentes antimicrobianos nos extratos de espécimes clínicos dos pacientes que ainda estão estocados na Disciplina de Microbiologia e Imunologia da UERJ.

Pelo menos três fatores são considerados importantes para que haja o desenvolvimento de PAVM: 1- a carga microbiana ou a colonização de patógenos respiratórios na região da orofaringe, 2- a aspiração subglótica que reduz o acúmulo secreções orais e previne a infiltração entre o *cuff* e a superfície glótica e, 3- a colonização da placa bacteriana por patógenos respiratórios (Efrati et al., 2010). No protocolo de higiene oral tentou-se abranger todos esses fatores, apesar de não ter ocorrido a redução dos supostos patógenos respiratórios da cavidade oral.

Os resultados demonstraram que a clorexidina pode até mesmo ser um agente capaz favorecer a pressão seletiva durante a colonização da cavidade oral por patógenos de circulação hospitalar em pacientes internados nas UTIs. Poucas são as investigações que estabeleceram a utilização de outros agentes antissépticos na cavidade oral. De modo geral, entre os agentes antimicrobianos utilizados a clorexidina é o principal agente químico de utilização em mucosas (Li et al., 2013). Trabalho que utilizou o antisséptico iodo povidona a 1% observou redução na PAVM, mas também não foi observada diferença entre o protocolo utilizando o antisséptico e o placebo (Chua et al., 2004). Da mesma forma, Seguin et al. (2014) não encontraram diferenças significativas entre os grupos de pacientes mantidos sob ventilação mecânica que utilizaram placebo ou o iodo-povidona a 1%, 6 vezes diariamente. As PAVM foram observadas em 31% dos pacientes tratados com iodo-povidona e em 28% dos pacientes que receberam placebo. Ao final, os autores afirmaram que não há evidência clínica para a recomendação de iodo-povidona para a prevenção do estabelecimento das PAVM em pacientes sob ventilação mecânica.

Os peptídeos antimicrobianos e pastas contendo antibióticos foram avaliados por diversos autores. O iseganan, um peptídeo antimicrobiano ativo contra micro-organismos aeróbios e anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos, foi testado com a finalidade de prevenir as PAVM. Novamente, não houve diferença estatística entre a utilização do Iseganan e o placebo na redução das PAVM. Assim, a preparação de peptídeo antimicrobiano Iseganan não teve a utilização indicada para a redução das PAVM (Kollef et al., 2006). As pastas antibióticas mostraram-se efetivas, porém não são amplamente utilizadas devido ao risco de desenvolvimento de resistência aos agentes antimicrobianos diversos (Panchabhai 2009; Shi et al., 2013). Em se tratando de UTI, onde há grande circulação de patógenos nosocomiais, muitos deles carregando genes de resistência aos antibióticos, a sua utilização na forma tópica

pode trazer riscos de pressão seletiva e favorecimento da disseminação dos genes de resistência entre os micro-organismos circulantes na UTI.

Enfim, a busca de outros agentes antissépticos que possam modular a colonização da cavidade oral por patógenos respiratórios continua sendo importante para reduzir o desenvolvimento das PAVM. São conhecidos agentes químicos mais recentes incluindo outras bisguanidas, compostos de amônio quaternário mais recentes, entre outros antissépticos, podendo ser componentes importantes para a redução da colonização da cavidade oral por patógenos respiratórios.

Tentativas de utilização de probióticos pareceram reduzir a incidência de PAVM em pacientes mantidos em ventilação mecânica. Em um dos trabalhos onde foi utilizado o *Lactobacillus rhamnosus* foi observada a redução nas PAVM (Morrow et al., 2010). Uma revisão sistemática recente (Wang et al., 2013) afirmou que a administração de probióticos não foi importante para a redução global das PAVM, entretanto reduziu o risco de PAVM causada por *P. aeruginosa*. A utilização de probióticos parece ser uma alternativa interessante para a utilização em pacientes mantidos sob ventilação mecânica uma vez que os micro-organismos probióticos tais como o gênero *Lactobacillus* são capazes de ocupar os sítios disponíveis à colonização de patógenos respiratórios, são resistentes às preparações contendo clorexidina, além de serem capazes de produzir bacteriocinas, capazes de eliminar grande parte dos micro-organismos presentes na mucosa. São necessárias mais investigações para o desenvolvimento de probióticos seguros para a utilização na cavidade oral de pacientes e que sejam inócuas ao trato respiratório inferior dos pacientes mantidos sob ventilação mecânica. Conforme observado no presente estudo os procedimentos de higienização da cavidade oral, apesar de não terem impedido a colonização da cavidade oral por patógenos de circulação hospitalar, são importantes na redução das taxas de PAVM e devem ser implementadas o mais breve possível em grande parte das UTIs, melhorando a qualidade de vida dos pacientes sob terapia intensiva e reduzindo os custos associados à terapia dos pacientes.

As perspectivas de inclusão dos dentistas na UTI são muito favoráveis e reforçam o seu papel como profissionais de saúde multidisciplinares, neste caso atuando na promoção da saúde de pacientes críticos, mantidos sob terapia intensiva e que os procedimentos aplicados a tais pacientes com os cuidados envolvendo a remoção do biofilme das superfícies dos tubos e da cavidade oral, a aspiração subglótica, a manutenção da cabeceira elevada, quando realizados com frequência e diariamente, são capazes de controlar o desenvolvimento das PAVM. Além disso, esforços necessitam de ser realizados para que a formação do

profissional de odontologia também abranja os conhecimentos acerca dos pacientes mantidos sob terapia intensiva, dentro desta provável nova especialidade da odontologia.

CONCLUSÕES

- 1- O protocolo descrito de higiene da cavidade oral direcionado aos pacientes da unidade de terapia intensiva do hospital investigado foi passível de aplicação por todos os profissionais da odontologia envolvidos nos cuidados e foi eficaz em reduzir as taxas de PAVM;
- 2- A inclusão dos profissionais da odontologia na UTI e as atividades desenvolvidas foram aceitas pela equipe permanente da UTI, trazendo benefícios ao paciente e ao ambiente de trabalho da equipe;
- 3- Ao contrário do esperado, a utilização do antisséptico, clorexidina a 0,12%, não impediu a colonização da cavidade oral por supostos patógenos de circulação hospitalar, tampouco eliminou tais organismos da microbiota antes da utilização dos procedimentos de higiene da cavidade oral dos pacientes internados nas UTI.

REFERÊNCIAS

- American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired ventilator-associated and healthcare-associated pneumonia. American Thoracic Society; Infection Diseases Society of America; Am J Respir Crit Care Med, 2005; 15(4):388-416.
- Barsic, B; Beus, I; Marton, E; Himbele, J; Kuzmanovic, N; Bejuk, D, et al. Antibiotic resistance among Gram-negative nosocomial pathogens in the intensive care unit: results of a 6-years body site monitoring. Clin Ther, 1997; 19(4): 691-700.
- Beck, J; Garcia, R; Heiss, G; Vokonas, OS; Offenbacher, S. Periodontal disease and cardiovascular disease. J Periodontol, 1996; 67(10 Supp):1123-1137.
- Bellissimo-Rodrigues F, Bellissimo-Rodrigues WT, Viana JM, Teixeira GC, Nicolini E, Auxiliadora-Martins M, et al. Effectiveness of oral rinse with chlorhexidine in preventing nosocomial respiratory tract infections among intensive care unit patients. Infect Control Hosp Epidemiol, 2009; 30(10):952-958.
- Berry AM, Davidson PM. Beyond comfort: oral hygiene as a critical nursing activity in the intensive care unit. Intensive Crit Care Nurs, 2006; 22(6):318-28
- Berry AM, Davidson PM, Masters J, Rolls K, Ollerton R. Effects of three approaches to standardized oral hygiene to reduce bacterial colonization and ventilator associated pneumonia in mechanically ventilated patients: a randomised control trial. Int J Nurs Stud, 2011 ; 48(6): 681-8.
- Birkedal-Hansen, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. J Periodontol Res, 1993; 28(6): 500-510.
- Bodey, GP; Bolivar, R; Fainstain, V; Jadela, L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Rev Infect Dis, 1983;5(2) : 279-313.
- Boersma WG. Assessment of severity of community-acquired pneumonia. Semin Respir Infect, 1999;14(2): 103-14
- Bopp M, Darby M, Loftin KC, Broschius S. Effects of daily oral care with 0.12% chlorhexidine gluconate and a standard oral care protocol on the development of nosocomial pneumonia in intubated patients: a pilot study. J Dent Hyg , 2006; 80: 9.
- Bosch, JA, De Geus, EJ, Veerman, EC, Hoogstraten, J, Nieuw Amerongen, AV. Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. Psychosom Med , 2003; 65(2):245-258.
- Brasil. Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). Infecções do trato respiratório orientações para prevenção de infecções relacionadas à assistência à saúde, 2009. Disponível

em<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/./manual_trato_respiratorio.pdf.htm>. Acesso em 15 dez 2013

BS EN 1276 (European Standard). Chemical disinfection and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of bacterial activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional areas – Test method and requirements (phase 2, step 1) 1997; Brussels: European Committee for Standardization.

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute. Antimicrobial susceptibility testing. Document M 100,2009.

Chua J, Dominguez EA, Sison, CMC, Berba RP. The efficacy of Povidone-iodine oral rinse in preventing ventilator associated pneumonia: a randomized, double-blind, placebo-controlled (VAPOR) trial: preliminary report. *Philippine J Microbiol Infect Dis*, 2004; 33(4): 153-161.

De Castro FR, Torres A. Optimizing treatment outcomes in severe community-acquired pneumonia. *Am J Respir Med*, 2003; 2(1): 39-54.

Deriso AJ II, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC. Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest*, 1996; 109(6): 1556-1561.

Deschpande, RG; Khan, M.; Genco, CA. Invasion strategies of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*: implications for cardiovascular disease. *Invasion Metastasis*, 1999;18(2): 57-69.

Edwards JR, Peterson KD, Mu Y, Banerjee S, Allen-Bridson K, Morrell G, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. *Am J Infect Control* , 2009; 37(10):783-805.

Efrati S, Deutsch I, Antonelli M, Hockey PM, Rozenblum R, Gurman Gm. Ventilator-associated pneumonia: current status and future recommendations. *J Clin Monit Comput*, 2010; 24: 161-8.

Erdem H, Inan A, Altindis S, Carevic B, Askarian M, Cottle L, et al. Surveillance, control and management of infections in intensive care units in Southern Europe, Turkey and Iran - A prospective multicenter point prevalence study. *J Infect*, 2014; 68(2):131-40.

Feider LL, Mitchell P, Bridges E. Oral care practices for orally intubated critically ill adults. *Am J Crit Care* , 2010;19(2):175-83.

Fourrier F, Duvivier B, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Chopin C. Colonization Of Dental Plaque: A Source Of Nosocomial Infections In Intensive Care Unit Patients. *Crit Care Med*, 1998;26(2): 301-308.

Gendron R; Grenier D; Maheu-Robert LF. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes and Infect*, 2000;2(8): 897-906.

Genuit T, Bochicchio G, Napolitano LM, Mccarter RJ, Roghman MC. Prophylactic chlorhexidine oral rinse decreases ventilator-associated pneumonia in surgical ICU patients. *Surg Infect (Larchmt)*, 2001;2(1): 5-18.

Gonçalves MO, Coutinho-Filho WP, Pimenta FP, Pereira GA, Pereira JA, Mattos-Guaraldi AL, Hirata R JR. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett Appl Microbiol*, 2007;44(5): 488-494.

Gromkova R, Koornhof H. Naturally occurring NAD-independent *Haemophilus parainfluenzae*. *J Appl Microbiol*, 1990; 136(6):1031-5.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD. Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 2001; 4: 9.

Holmstrup P, Poulsen AH, Andersen L, Skuldbøl T, Fiehn NE. Oral infections and systemic diseases. *Dent Clin North Am*, 2003;47(3):575-98.

Ibrahim EH, Tracy L, Hill C, et al. The occurrence of ventilator-associated pneumonia in a community hospital: risk factors and clinical outcomes. *Chest*, 2001; 20(2):555-561

Klompas M, Kleinman K, Khan Y, Evans RS, Lloyd JF, Stevenson K, et al. Prevention Epicenters Program. Rapid and reproducible surveillance for ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis*, 2012; 54(3):370-7.

Kollef M, Pittet D, Sánchez García M, Chastre J, Fagon JY, Bonten M, et al. Prevention of Pneumonia Study (POPS-1) Trial Group. A randomized double-blind trial of iseganan in prevention of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006; 173(1):91-7.

Kornman KS; Page RC; Tonneti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol* 2000, 1997; 14: 33-53.

Li J, Xie D, Li A, Yue J. Oral topical decontamination for preventing ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Hosp Infect*, 2013; 84(4): 283-93.

McDonald JR. Acute infective endocarditis. *Infect Dis Clin North Am*, 2009; 23(3): 643-664.

Machado De Oliveira, JC, Siqueira, J.F.Jr.; Rôças, I.N.; Baumgartner, J.C.; Xia, T.; Peixoto, R.S.; Rosado, A.S. Bacterial community of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol and Immunol*, 2007; 22: 14-18,

Macnaughton SJ, Stephen JR, Venosa AD, Davis GA, Chang YJ, White DC. Microbial population changes during bioremediation of an experimental oil spill. *Appl Environ Microbiol*, 1999; 65(8): 3566-3574.

McCune B, Mefford MJ. *Multivariate Analysis of Ecological Data*. Version 5.32 MjM Software, Gleneden Beach, Oregon, U.S.A. 2006.

- Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC. Infectious Diseases Society of America; American Thoracic Society. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults. *Clin Infect Dis*, 2007;44 Suppl 2: S27-72.
- Martin, MC; Andrés, MT; Fierro, JF; Méndez, FJ. Endarteritis and mycotic aortic aneurysm caused by an oral strain of *Actinobacillus actinomycetencomitans*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1998, 17(2): 104-107.
- Matijašić BB, Obermajer T, Lipoglavšek L, Grabnar I, Avguštin G, Rogelj I. Association of dietary type with fecal microbiota in vegetarians and omnivores in Slovenia. *Eur J Nutr*, 2013 *in press*
- Meyer, DH; Fives-Taylor, PM. . Oral pathogens: from dental plaque to cardiac disease. *Curr Opin Microbiol*, 1998; 1(1): 88-95.
- Mojon P. 2002. Oral health and respiratory infection. *J Can Dent Assoc* , 68(6): 340-345.
- Mohammadzadeh H, Yáñez-Ruiz DR, Martínez-Fernandez G, Abecia L. Molecular comparative assessment of the microbial ecosystem in rumen and faeces of goats fed alfalfa hay alone or combined with oats. *Anaerobe* 2013 *in press*
- Morrow LE, Kollef MH, Casale TB. Probiotic prophylaxis of ventilator-associated pneumonia: a blinded, randomized, controlled trial. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010; 182(8):1058-64.
- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and Cultural Analysis of the Microflora Associated with Endodontic Infections. *J Dent Res*, 2002; 81(11), 761-766.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG: Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 1993; 59(3):695–700.
- Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, et al. American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001; 163(7):1730-1754.
- Nübel U, Engelen B, Felske A, Snaidr J, Wieshuber A, Amann RI, Ludwig W, Backhaus H. Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol*, 1996; 178(19):5636-43.
- Offenbacher, S; Katz, V; Fertik, G; Collins, J; Boyd, D; Maynor, G; Mckaig, R; Beck, J. Periodontal disease as a possible risk factor for preterm low birth weight. *J Periodontol* , 1996; 67(10 Suppl): 1103-1113.
- Paju S, Scannapieco Fa. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis*, 2007; 13(6): 508-512.

Panchabhai TS, Dangayach NS, Krishnan A, Kothari VM, Karnad DR. Oropharyngeal cleansing with 0.2% chlorhexidine for prevention of nosocomial pneumonia in critically ill patients: an open-label randomized trial with 0.01% potassium permanganate as control. *Chest*, 2009; 135(5):1150-6.

Pathak S, Awuh JA, Leversen NA, Flo TH, Asj  B. Counting mycobacteria in infected human cells and mouse tissue: a comparison between qPCR and CFU. *PLoS One*, 2012; 7(4): e34931

Pierce D, Calkins BC, Thornton K. Infectious endocarditis: diagnosis and treatment. *Am Fam Physician*, 2012; 85(3): 981-986.

Prendergast V, Kleiman C, King M. The Bedside Oral Exam and the Barrow Oral Care Protocol: translating evidence-based oral care into practice. *Intensive Crit Care Nurs*, 2013; 29(5):282-90

Quartin AA, Scerpella EG, Puttagunta S, Kett DH .A comparison of microbiology and demographics among patients with healthcare-associated, hospital-acquired, and ventilator-associated pneumonia: a retrospective analysis of 1184 patients from a large, international study. *BMC Infect Dis*, 2013; 27(13):561.

Queen MA, Myers AL, Hall M, Shah SS, Williams DJ, Auger KA, et al. Comparative effectiveness of empiric antibiotics for community-acquired pneumonia. *Pediatrics*, 2014; 133(1): e23-9.

Rams TE; Slots J. Systemic manifestations of oral infections. In: Slots, J; Taubman, MA, editores. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*. Mosby-Year Book;1992

Remely M, Aum ller E, Merold C, Dworzak S, Hippe B, Zanner J, et al. Effects of short chain fatty acid producing bacteria on epigenetic regulation of FFAR3 in type 2 diabetes and obesity. *Gene*. 2013 *in press*.

Ribeiro AC, Matarazzo F, Favari M, Zezell DM, Mayer, MPA. Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *J Endod* 2011; 37, 922-926,

Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Crit Care Med* , 1999; 27: 887 - 92.

Rolleke S; Muyzer G; Wawer C; Wanner G; Lubitz W. 1996. Identification of Bacteria in a Biodegraded Wall Painting by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-Amplified Gene Fragments Coding for 16S Rrna. *Appl Environ Microbiol*, 1996; 62(6): 2059-2065

Scannapieco, FA. 1999. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol*, 1999; 70(7): 793-802

Scannapieco, FA; Mylotte, JM. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. *J Periodontol*, 1996; 67(10 Suppl): 1114-1122

Scannapieco FA; Papandonatos GD; Dunford RG. Associations between oral conditions and respiratory disease in a national sample survey population. *Ann Periodontol*, 1998; 3(1): 251-256.

Seguin P, Laviolle B, Dahyot-Fizelier C, Dumont R, Veber B, Gergaud S. Study of Povidone Iodine to Reduce Pulmonary Infection in Head Trauma and Cerebral Hemorrhage Patients (SPIRIT) ICU Study and AtlanRéa Groups. Effect of oropharyngeal povidone-iodine preventive oral care on ventilator-associated pneumonia in severely brain-injured or cerebral hemorrhage patients: a multicenter, randomized controlled trial. *Crit Care Med*, 2014; 42(1):1-8.

Shi Z, Xie H, Wang P, Zhang Q, Wu Y, Chen E, Worthington Hv, Needleman I, Furness S. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database of Syst Rev*, 2013; 8: CD008367.

Siqueira JF JR. *Treatment of Endodontic Infections*. Rio de Janeiro, Quintessence. 2011.

Siqueira JF.JR, Rôças I.N. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent*, 2003; 31, 333-339.

_____. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 1 – Current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod*, 2005; 31, 411-422,

Siqueira, JF JR, Rôças I.N, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol*, 2004; 19, 363-369,

_____. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of endodontic infections. *J Endod*, 2005;31: 775-781.

Siqueira JF JR, Rôças I.N, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000; 89, 744-748.

Thakuria B, Singh P, Agrawal S, Asthana, V. Profile of infective microorganisms causing ventilator-associated pneumonia: A clinical study from resource limited intensive care unit. *J Anaesthesiol, Clin Pharmacol* 2013; 29(3): 361-366.

Treloar DM, Stechmiller JK. 1995. Use of a clinical assessment tool for orally intubated patients. *Am J Crit Care*, 1995; 4(5): 355-360.

Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *J Am Med Assoc*, 1995; 274: 639-44.

Wang J, Liu KX, Ariani F, Tao LL, Zhang J, Qu JM. Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis of high-quality randomized controlled trials. *PLoS One*. 2013;8 (12): e83934.

Westphal N, Plicht B, Naber C. Infective endocarditis-prophylaxis, diagnostic criteria, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 2009;106: 481-489;

Yamasaki K, Kawanami T, Yatera K, Fukuda K, Noguchi S, Nagata S, et al. Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. *PLoS One*. 2013;8:e63103

Yoneyama T, Yoshida M, Ohru T, Mukaiyama H, Okamoto H, Hoshiba K, et al. Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc* , 2002; 50(3): 430-433.

Zhang TT, Tang SS, Fu LJ. The effectiveness of different concentrations of chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *J Clin Nurs*, 2013; *in press*.

APÊNDICE - Questionário: “Percepções acerca da atuação do cirurgião-dentista nas unidades de terapia intensiva”

QUALIFICAÇÃO PROFISSIONAL:

- Médico
- Enfermeiro
- Fisioterapeuta
- Técnico de Enfermagem

TEMPO DE ATUAÇÃO NA ÁREA () ANOS

Você considera oferecer cuidados em saúde bucal aos pacientes um fator diferencial no âmbito do atendimento em Terapia Intensiva?

- MUITO FORTE MÉDIO
- FORTE POUCO

Você percebeu alguma alteração com relação ao ODOR do PACIENTE (HALITOSE) após a implantação dos cuidados de higiene bucal?

- SIM NÃO NÃO OBSERVADO

Você percebeu alguma alteração com relação ao ODOR do AMBIENTE do CTI após a implantação dos cuidados de higiene bucal?

- SIM NÃO NÃO OBSERVADO

Você observou redução na presença de ÚLCERAS ou FERIDAS BUCAIS/LABIAIS durante o tempo de internação dos pacientes após a instituição dos cuidados de higiene bucal?

- SIM NÃO NÃO SEI

Você observou redução na ocorrência das secreções nasais e bucais após a implantação dos cuidados de higiene bucal?

- SIM NÃO NÃO SEI

Houve melhoria das condições do atendimento ao paciente (i.e., a realização dos procedimentos de atenção direta se tornou mais agradável) após a implantação dos cuidados de higiene bucal?

- SIM NÃO NÃO SEI

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas

CONSENTIMENTO INFORMADO

Prezado Colega,

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa mediante o preenchimento de um questionário, com o objetivo de analisar as “Percepções Acerca da Atuação do Cirurgião-Dentista nas Unidades de Terapia Intensiva”. Os procedimentos de higiene da cavidade bucal dos pacientes internados no CTI do Hospital Central da Aeronáutica foram efetivamente estabelecidos em Abril de 2010 e é do interesse dos Dentistas que realizam essas tarefas traçar um perfil do desempenho destes procedimentos ao longo desse período. Cabe ressaltar a importância da sua participação voluntária e a garantia do seu anonimato firmado no presente termo.

Rio de Janeiro, de de 2013.

Concordo em participar da pesquisa:

Nome: _____

Assinatura: _____

Serviço participante:

CTI do Hospital Central da Aeronáutica

Maj. Dent. Marcia Bertolossi **Hirata**.

Orientadores na FCM/UERJ - telefone: **(21) 2868-8280**.

Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Raphael Hirata Júnior

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Rio de Janeiro, 1º de Fevereiro de 2012

Do: Comitê de Ética em Pesquisa

Prof.: Wille Oigman

Para: Aut. Márcia Bertolossi Hirata / Orient. Prof. Raphael Hirata Junior

Registro CEP/HUPE: 3125/2011 (este número deverá ser citado nas correspondências referentes ao projeto)

CAAE: 0265.0.228.000-11

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, após avaliação, considerou o projeto, "ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE AGENTES ANTI-SÉPTICOS BUCAIS NA PREVENÇÃO DE PNEUMONIAS NOSOCOMIAIS EM PACIENTES DE UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA" aprovado, encontrando-se este dentro dos padrões éticos da pesquisa em seres humanos, conforme Resolução n.º196 sobre pesquisa envolvendo seres humanos de 10 de outubro de 1996, do Conselho Nacional de Saúde, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O pesquisador deverá informar ao Comitê de Ética qualquer acontecimento ocorrido no decorrer da pesquisa.

O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.

Prof. Wille Oigman
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Faculdade de Ciências Médicas
Programa de Pós Graduação em Ciências Médicas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Projeto de Pesquisa: “Análise da eficiência de agentes anti-sépticos bucais na prevenção de pneumonias nosocomiais em pacientes de unidade de terapia intensiva”.

Serviço participante:

CTI do Hospital Central da Aeronáutica

Maj. Dent. Marcia Bertolossi **Hirata**.

Orientadores na FCM/UERJ - telefone: **(21) 2868-8280**.

Ana Luíza de Mattos Guaraldi

Raphael Hirata Júnior

Comitê de Ética em Pesquisa Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ- telefone: **(21)2868-8253**

Nome do voluntário (a): _____

Sr. Responsável,

O seu familiar, que está internado no CTI do HCA, está sendo CONVIDADO a participar, como voluntário, de uma investigação científica com objetivo de avaliar a eficiência da higiene bucal e da aplicação de um produto para higiene bucal a base de clorexidina sobre o crescimento de micróbios capazes de causar doenças respiratórias, na boca dos pacientes internados.

Neste estudo será investigada a presença na cavidade bucal de micróbios que podem estar envolvidos no desenvolvimento de pneumonias hospitalares, e o efeito dos métodos de higiene bucal com aplicação de solução um produto para higiene da boca a base de clorexidina (0,12%) sobre o crescimento desses micróbios. O desenvolvimento da pesquisa

precisará de coletas de material de mucosa bucal antes e após a realização dos procedimentos de higiene realizados na boca do paciente.

Este documento deve fornecer a (ao) Sr.(a) as informações necessárias sobre todos procedimentos a serem adotados.

O (a) Sr. (a) poderá recusar-se a participar da pesquisa ou mesmo dela afastar-se em qualquer tempo sem que este fato lhe venha causar constrangimento, penalidade por parte da instituição, interrupção de seu tratamento ou realização de exames laboratoriais.

Os pesquisadores obrigam-se a não revelar identidade dos pacientes em qualquer publicação resultante deste estudo.

A pesquisa será custeada pelas Instituições envolvidas.

Após a análise dos resultados desta pesquisa, eles serão apresentados a todos interessados.

Antes de assinar este termo, o (a) Sr.(a) deve informar-se plenamente não hesitando em formular perguntas sobre qualquer aspecto que julgar conveniente esclarecer. É importante estar ciente das seguintes informações:

1- **Objetivo da investigação:** Avaliar a presença de microrganismos capazes de causar pneumonias por uso de ventilação mecânica na cavidade oral, e o efeito do protocolo de higienização bucal com aplicação de clorexidina, na eliminação dos mesmos.

2- **Procedimentos que serão realizados:** Neste estudo serão realizadas coletas de amostras através de **swabs** (um tipo de cotonete)que será passado na mucosa bucal dos pacientes internados no centro de terapia intensiva do Hospital Central da Aeronáutica, onde os procedimentos de higienização bucal são realizados rotineiramente. A primeira coleta será realizada no momento da internação no CTI, antes da realização dos protocolos de higiene bucal e coletas serão realizadas 07 e 14 dias após a internação no CTI.

3- **Benefícios da pesquisa:** A pesquisa permitirá a determinação da eficiência do procedimento de higiene com a utilização da clorexidina na eliminação de supostos patógenos envolvidos em pneumonias que são capazes de colonizar a cavidade oral.

4- **Riscos potenciais:** Não há riscos, pois o procedimento já é aplicado a todos os pacientes.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, decidindo-me a participar da investigação proposta, depois de ter formulado as perguntas e de ter recebido respostas satisfatórias a todas elas, e ciente de que poderei voltar a fazê-las a qualquer tempo.

Declaro, pois, dar meu consentimento para participar desta investigação estando ciente ainda de que esta cópia permanecerá arquivada com o pesquisador.

Caso tenha alguma dúvida ou necessidade de esclarecimento sobre o estudo você pode entrar em contato, a qualquer momento, com os pesquisadores envolvidos.

_____	_____	_____
Nome	Assinatura	Data

_____	_____	_____
Nome	Assinatura do representante do sujeito(paciente)	Data

_____	_____	_____
Nome do Pesquisador	Assinatura do pesquisador	Data

ANEXO B - Formato final do 1^o artigo científico submetido

The Task of Dentists in an Intensive Care Unit in Brazil: The Experience of a Military Hospital.

1- Marcia Bertolossi Hirata ^{*}, DDS, Major at Central Military Hospital of Brazilian Air Force, Rio de Janeiro, Brazil, and MSc student at Post-graduation Program in Medical Science, School of Medicine, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

2- Josiane Costa Rodrigues de Sá^{*}, DDS, MSc and PhD, 1st Lieutenant at Central Military Hospital of Brazilian Air Force, Rio de Janeiro, Brazil.

3- Isabela Soares de Castro, DDS and MSc, 1st Lieutenant at Central Military Hospital of Brazilian Air Force, Rio de Janeiro, Brazil.

4- Pedro Luís Naglis Tibúrcio, MD, Captain at Central Military Hospital of Brazilian Air Force, Rio de Janeiro, Brazil.

5- Luiggi Miguez Dantas, MD, 1st Lieutenant at Central Military Hospital of Brazilian Air Force, Rio de Janeiro, Brazil.

6- Ana Luiza Mattos Guaraldi, MSc, PhD, Professor, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, School of Medicine, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

7- Raphael Hirata Junior, DDS, MSc, PhD, Professor, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, School of Medicine, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

Short Title: Dentists in intensive care units

Corresponding author: Raphael Hirata Junior

Av. 28 de Setembro 87 fds, Prédio Américo Piquet Carneiro, 3º Andar Microbiologia.

Postal Code: 20551-030, Phone: 55 21 2868-8280

Email: hirata@uerj.br

* MBH and JCRS contributed equally for establishment and application of the oral hygiene protocol.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the practice of dentists in an intensive care unit (ICU) of a military hospital, the establishment of a protocol for oral hygiene, and the effect of the protocol on the reduction of ventilator associated pneumonia (VAP).

Methods: The oral hygiene protocol was established and the data of VAP collected from the records of the Committee of Hospital Infection Control, during a period of two years before and after the application of the protocol. The activity of the dentists in the ICU was evaluated by means of a questionnaire answered by the staff.

Results: The oral hygiene protocol administered by dentists was capable to reduce the incidence of VAP ($P < 0.05$). The change of the oral odor was noticed by 93.33%. The reduction of oral and lip ulcers during the hospitalization of the patients was observed by 80% of the staff. The patients were observed to reduce the production of oral and nasal secretions after the establishment of the oral hygiene procedures for 70% of the ICU professionals. The approach to the patients developed by the staff became more pleasant after the establishment of the oral protocol for 86.66%.

Conclusions: The oral hygiene protocol developed by dentists was capable to reduce the incidence of VAP and to improve the approach of the staff to ICU patients, oral breath, reducing the oral ulcers.

Clinical significance: The oral hygiene protocol with active participation of dentists is capable to improve the quality of life of critically ill patients from ICU.

Keywords: Ventilator associated pneumonia. Intensive care. Chlorhexidine. Oral Microbiota. Oral hygiene protocol.

INTRODUCTION

Since the first presentation of the Law Project 2.776/2008 on National Congress in Brazil that proposed the action of dentists in intensive care units (ICU), the Health Service of Brazilian Air Force, through the normative order number 005 DIRSA from 25th April, 2008, accomplished to the law Project, and in 2010 the service was established in the ICU of the Hospital Central da Aeronáutica to facilitate the oral hygiene, and perform minor oral procedures in patients under intensive care treatment.

There is increasing evidence suggesting a link of dental plaque/oral cavity colonization with respiratory pathogens in intensive care patients and ventilator-associated pneumonia.^{1,2,3} After urinary tract infections, the second most common infection in critical ill patients is ventilator-associated pneumonia (VAP), and constitutes a leading cause of mortality and morbidity. Ventilator-associated pneumonia is a common and highly morbid condition in critically ill patients, occurring in 9 - 68% of patients treated with mechanical ventilation. Mortality rates range from 33 to 71% and can be higher in specific immunocompromised and high-risk patients^{4,5,6,7,8}.

Though oral hygiene protocols accompanied with the use of 0.12% chlorhexidine solutions are capable to reduce the incidence of VAP, the procedures are usually performed by nursing professionals around the world, including in Brazilian hospitals⁹. Oral hygiene, together with subglottal suctioning and head of bed elevation has been proposed as an important strategy in reducing the incidence of VAP¹⁰. The dentists in an ICU should be aware to observe the presence of: 1- debris and biofilms retained in the oral cavity, 2- mucositis, 3- oral lesions due to compression by the tubes, 4- other lesions in oral cavity such as candidosis¹¹, 5- the accumulation of oral secretions, and to drive the best treatments to those critical care patients, including the need of brief dental procedures, to ameliorate the quality of life to critical ill patients¹².

Since the dental professionals were included to the service in an ICU of a Military Hospital in 2010, this study aimed to analyse the rates of VAP after the establishment of oral care ministered by dentists. In addition we have evaluated the effect of the activity of a new professional in the routine of ICU, through the information obtained from a questionnaire answered by the staff.

MATERIALS AND METHODS

Intensive Care Unit and Procedures: The Hospital Central da Aeronáutica has a 9 bed ICU capable to receive adult chronic patients, and eventually post-operative patients from surgical specialties of head and neck, otorhinolaryngology, urology, and general surgery. In April, 2010 the dentists were definitively included in the ICU of the Hospital to manage the oral care in hospitalized patients. Thereafter, the patients received the oral care performed daily by one official dentist of the Air Force, following a suitable oral hygiene protocol to the characteristics of the service, alongside the adequate procedures of aspiration of both oral and subglottic secretions, and application of 0.12% Chlorhexidine solution. All patients received the care procedures twice a day, since there is not a once daily universal protocol. The protocol was not designed as a controlled study but rather as a quality improvement initiative¹³. The measures adopted to the patients are described as follows: 1- Clinical examination of the oral status and patient's systemic conditions after query of the records; 2- Intraoral physical examination, with attention to bleeding areas, change in the color of mucous membranes, presence of ulcers (especially to tube contact ulcers, and ulcers with pseudomembranes suggestive of candidosis), teeth mobility due to periodontitis and presence in volume and quality of the saliva produced, halitosis, trauma, biofilm accumulation in both teeth surface and tubes, and collection of smear for cytopathology analysis of oral mucosa; 3- Preparation of the plans for the treatment, in accordance to the intensive care physicians; 4- Relief of the pain and adequacy of the oral milieu.

The protocol proposed and performed by the dentists to the patients comprised as follows: 1- explanation to the patients and/or to the family that hygiene procedures would be performed; 2- Check that bed headboard is elevated to 30°- 45°; 3- aspiration of the mouth and oropharynx, removal of debris and crusts from the lips with enzymatic solution (a non-alcoholic mouthrinse, containing an enzymatic system composed of lactoperoxidase, glucose

oxidase, lysozyme and lactoferrin); 4- mechanical debridement with gauze of the tongue coating and tubes (when present) with enzymatic solution; 5- biofilm removal from teeth by using a soft toothbrush and non-foaming dentifrice; 6- removal of the dentifrice from the oral cavity with the aid of sterile saline solution and subsequent aspiration; 7- application of humectants gel in oral mucosa and cocoa butter or petrolatum on the lips; 8- notify, even when necessary, for the change of the fixation of oral tubes; 9- dentures were removed, cleaned and immersed in a 0.12% chlorhexidine solution; 10- unconscious patients submitted to mechanical ventilation or using nasogastric tubes remained without dentures. At the end of the procedure a final oral washing with 0.12% chlorhexidine solution was performed to maintain the hygiene between the intervals of the procedures¹⁴.

Incidence of VAP and index of mechanical ventilation: Incidence of VAP and index of mechanical ventilation were obtained from the monthly reports from the ICU to the Committee for Hospital Infection Control, as stated by NNISS. In this investigation the data were analyzed from 2009 to 2013, and the oral procedures performed by the dentists started in 2010¹⁵.

Opinion of the ICU team concerning to oral care measures performed by dentists – the questionnaire: A total of 06 assertive questions comprising the perceptions of the staff about the activity of the dentists in intensive care units were passed to 30 professionals working in the ICU. All professionals signed the consent term previously to respond the unidentified questionnaire, to preserve the reliability and confidence of the responses. The formation (graduation in medicine, nursery, or physiotherapy) or technical formation in nursery (nursing assistant) and time of experience in the ICU were the first queries. The questions posed are detailed in the **Table 1**.

Statistical Analysis and Ethical Aspects: The rate of ventilator associated pneumonia per month was compared annually after the initiation of the activity of the dentists in the ICU.

The comparison by year of activity was performed through one way ANOVA with Tukey's Multiple Comparisons Test by GraphPad Prism 5.0. The study protocol was approved by The Institutional Review Committee, Hospital Universitário Pedro Ernesto/Universidade do Estado do Rio de Janeiro (N° 3125/2011 – CAAE 0265.0.228.000-11).

RESULTS

Effect of oral procedures on the rates of VAP: The procedures performed by dentists were capable of reducing the VAP incidence, alongside other procedures on the ICU performed by intensive care physicians, reducing the index of mechanical ventilation ($P < 0.05$ (2011-2012)), especially on the first year after the application of oral care measures. The index of mechanical ventilation during the period of 2012-2013 returned to similar rates ($P > 0.05$) observed before the activities of the dentists in the ICU. The rate of VAP reduced from 25.08 ± 2.855 per 1000 days of use of mechanical ventilation in the year when the dentists were admitted to the ICU (2010-2011) to 13.45 ± 2.395 on the first year after the establishment of oral care measures (2011-2012, $P < 0.05$), and maintained without statistical difference, but with a tendency to reduce (10.90 ± 2.694 , $P > 0.05$) on the period of 2012-2013; during the second year the index of mechanical ventilation was not significant different from the previous years (**Figure 1**).

Opinion of the ICU professionals concerning the oral care measures: After the establishment of the oral care measures some professionals, especially intensive care physicians and physiotherapists, brought information to the dentists about the modifications of the environment's odor, and halitosis and secretions produced by the patients. These perceptions were used to set up the questionnaire presented in the **Table 1**. A total of 08 physicians, 08 nurses, 04 respiratory therapists, 06 nursing assistants and 4 other professionals related to health care in ICU patients were enrolled in the questionnaire. The time of experience in the ICU were estimated to 137.73 months. Considering of offering oral care procedures to ICU patients was a positive factor for intensive care patients for 96.66% of the professionals. The change of the oral odor was noticed by 93.33%, as well as the odor of ICU's environment after the establishment of oral care measures for 60% of the staff. The reduction of oral and lip ulcers during the hospitalization of the patients was observed by 80%

of the staff. The patients were observed to reduce the production of oral and nasal secretions after the establishment of the oral hygiene procedures for 70% of the ICU professionals. The general procedures approached to the patients by the staff became more pleasant to perform for 86.66%, after the establishment of the oral hygiene procedures. Based in the responses obtained after the analysis of the questionnaire, the activity of the dentists has improved the oral health of the inpatients from the studied ICU, and enhanced the general care assistance to the patients.

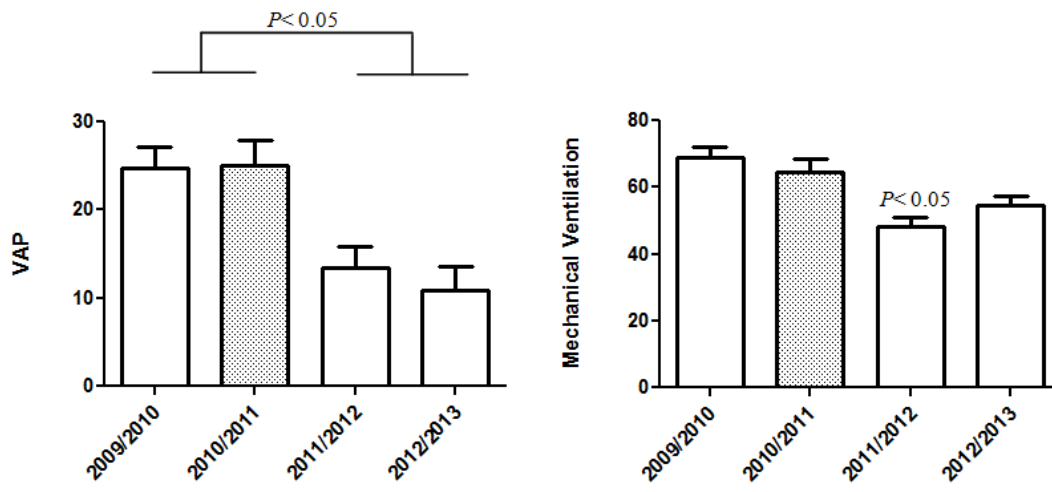


Figure 1: Incidence of ventilator associated pneumonia per 1000 days of ventilation and the use of mechanical ventilation during the period of the study. ■ Year when dentists were admitted to the intensive care unit.

Table 1- Questionnaire applied to the professionals acting on the ICU, and percentages of the responses to the assertive questions.

Questions	Assertive issues	% of responses to the questions
Q1: Do you consider offering oral care procedures to ICU patients a positive factor within the intensive care assistance?	1- Very strong,	1- 73.33%
	2- Strong;	2- 23.33%
	3- Medium;	3- 0%
	4- Weak	4- 0%
	5- Not answered	5- 3.33%
Q2: Have you perceived any change on patients' breath odor (halitosis) after the establishment of the oral care measures?	1- Yes	1- 93.33%
	2- No	2- 3.33%
	3- Not observed	3- 3.33%
	4- Not answered	4- 0%
Q3: Have you noticed any change on the ICU environment's odor after the establishment of the oral care measures?	1- Yes	1- 60%
	2- No	2- 20%
	3- Not observed	3- 20%
	4- Not answered	4- 0%
Q4: Have you observed a reduction in the occurrence of ulcers in the mouth or lips during the time of hospitalization of the patients after the establishment of the oral care measures?	1- Yes	1- 80%
	2- No	2- 0%
	3- Don't Know	3- 20%
	4- Not answered	4- 0%
Q5: Have you noticed a reduction of oral and nasal secretions (discharges) after the establishment of oral hygiene care procedures?	1- Yes	1- 70%
	2- No	2- 10%
	3- Don't Know	3- 20%
	4- Not answered	4- 0%
Q6: Was there any improvement on patient's assistance (the usual procedures became more pleasant to perform) after the establishment of oral hygiene procedures?	1- Yes	1- 86.66%
	2- No	2- 3.33%
	3- Don't Know	3- 10%
	4- Not answered	4- 0%

DISCUSSION

Ventilator associated pneumonia is one of the most common nosocomial acquired infections in patients receiving mechanical ventilation in intensive care units¹⁶. VAP occurs in 9-27% of all intubated patients. As common complication, VAP causes lengthening in hospital internalisation, increasing the costs of the treatments¹⁷. As observed earlier with ICU patients from surgical¹⁸ and heart surgery¹⁹, the established protocol with the use of 0.12% chlorhexidine solution, was capable to reduce and maintain VAP incidence after two years of the beginning of oral hygiene procedures performed by dentists. The protocol used in this study was improved from the guidelines established in the normative order number 005 DIRSA from 25th April, 2008, and adapted to the characteristics of the adult chronic patients in the routine of ICU, most of them elderly patients with several co-morbidities. The reduction of VAP after the first year of execution of the protocol corresponded to 46.37%, and to 56.63% in the second year of oral hygiene procedures. A recent study²⁰ has found a reduction of 50.12% in VAP incidence, a level similar to obtained in this investigation.

The index of mechanical ventilation decreased ($P < 0.05$) after the first year (2011/2012) since the establishment of oral procedures performed by dentists, which might justify the reduction of VAP. Though significantly when compared to the previous years the reduction of mechanical ventilation was about 25.46% (when compared to 2010/2011), whereas the decrease of VAP was 46.37%. The only modification on procedures to the patients of the ICU was the introduction of the oral hygiene protocol, and after the second year of the application of oral hygiene procedures (2012/2013) the mechanical ventilation returned to comparable levels as observed previously (2009/2010, 2010/2011, and 2011/2012; $P > 0.05$), though PAV continued to decrease ($P < 0.05$) as compared to 2009/2010 and 2010/2011.

Although PAV has reduced significantly with the implementation of oral hygiene protocol, the incidence of PAV in our Hospital remains high (10.90 per 1000 days of

mechanical ventilation), and efforts to reduce PAV are still necessary. In the United States, the average of incidence of PAV in ICU with similar beds is 1.9 per 1000 days of ventilation²¹. Nevertheless, it is worthy to emphasize that the investigated ICU receive chronic elder patients with a mean age of 72.6 years old (data not shown), many of them presenting immune senescence circumstances leading to more severe clinical conditions. However, PAV index is still reducing with the continuous application of the established oral hygiene protocol.

The concern by the staff of offering oral hygiene to inpatients from the ICU was considered as important by 96.66% of the staff (sum of the answers very strong and strong). There is a general understanding that oral hygiene may improve the quality of life of patients submitted to intensive care treatment, alongside the maintenance of the health, reducing the VAP index²². Concerning to the oral care measures to ICU patients administered by dentists, who are more capable to perform minor oral procedures including elimination of biofilms and calculus, root extractions (when necessary), and treatments to remove sharp edges of teeth and prostheses diminishing the trauma to mucosal surfaces, the perception of the staff revealed the reduction of both halitosis (93.33%) and a decrease of intraoral and lip ulcers (80%) amongst the patients submitted to intensive care hospitalisation. The development of stomatitis increases the risk of pathogen translocation and can result in a number of adverse consequences such as sepsis and subsequent multiple organ failure²³. In addition, the proper diagnosis of some kinds of ulcerative lesions, such as candidosis (after collection by scraping biopsy), direct the treatment with nistatin, procedure that is not performed by nursing assistants. Although oral hygiene is a fundamental practice that nursing professionals provide for their patients, undertaking this practice by professionals in the ICU can be challenging due to a range of reasons²⁴. Some key barriers related to achieving optimal oral hygiene can be classified as mechanical obstacles (such as endotracheal tubes and devices to fix tubes), professional perceptions of patient discomfort and communication barriers between

professionals and unconscious patients. In addition, nursing professionals generally have inadequate instruments to approach oral care in critically ill patients. In fact, ICU nurses require rigorous information to offer adequate oral hygiene procedures²² that is usually accomplished by dentists during the practice learnt in the course of dental schools.

After approximately 3 months of starting the procedures of oral hygiene the physicians have related the modification of the odour on the environment of the ICU, and the respiratory therapists noted the patients less secretive and sinusitis were seen in less frequency, justifying the questions 3 and 5 of the questionnaire. These questions were coincidently to the opinions of ICU's staff in 60% and 70%, respectively. In both questions the responses as don't know appeared in 20% of the cases. As being questions formulated after perceptions of selective groups of ICU's professionals, and due to the questionnaire had been applied in a blind manner, without the identification of the professional that answered each one, it was impossible to localize the groups that initially perceived those effects. Other investigations are necessary to confirm these findings with more comprehensive studies, in the fields of intensive medicine.

The perspectives of inclusion of dentists in the ICU are very strong, reinforcing their role as multidisciplinary health professionals. The effects of the oral hygiene protocol not only reduced the VAP in this ICU, but also rendered other benefits on the general health and on improvement of quality of life to the patients submitted to intensive care treatment.

Acknowledgements: This work was supported by grants from CNPq, CAPES, FAPERJ, SR-2/UERJ, and Programa de Núcleo de Excelência (PRONEX) of the Brazilian Ministry of Science and Technology. We are grateful to Prof. Dr. Renata Nunes Aranha for the previous evaluation and suggestions in the order of the questions of the questionnaire.

References

- 1- Fourrier F, Duvivier B, Boutigny H, Roussel-Delvallez M, Chopin C. Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. *Critical Care Medicine* 1998 ;**26**(2):301-8.
- 2- Scannapieco FA, Mylotte JM. Relationship between periodontal disease and bacterial pneumonia. *Journal of Periodontology* 1996; **67**(10 Suppl):1114-22.
- 3- Paju S, Scannapieco FA Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Diseases* 2007 ; **13**(6): 508–512.
- 4- Eggimann P, Pittet D. Infection control in the ICU. *Chest*. 2001 Dec; **120**(6):2059-93.
- 5- Fleming CA, Balaguera HU, Craven DE. Risk factors for nosocomial pneumonia: Focus on prophylaxis. *The Medical Clinics of North America* 2001;**85**(6):1545-63.
- 6- Koeman M, van der Ven AJ, Ramsay G, Hoepelman IM, Bonten MJ. Ventilator-associated pneumonia: recent issues on pathogenesis, prevention and diagnosis. *The Journal of Hospital Infection* 2001;**49**(3):155-62.
- 7- Fagon JY. Prevention of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Medicine*. 2002; **28**(7):822-3.
- 8- Apostolopoulou E, Bakakos P, Katostaras T, Gregorakos L. Incidence and risk factors for ventilator-associated pneumonia in 4 multidisciplinary intensive care units in Athens, Greece. *Respiratory Care* 2003; **48**(7):681-8.
- 9- Cason CL, Tyner T, Saunders S, Broome L; Centers for Disease Control and Prevention. Nurses implementation of guidelines for ventilator-associated pneumonia from the Centers for Disease Control and Prevention. *American Journal of Critical Care* 2007; **16**(1):28-36.
- 10- Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Briedges C, Hajjeh R; CDC; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recommendations Reports* 2004; **26**; 53(RR-3):1-36.
- 11- Wade WG. New aspects and new concepts of maintaining "microbiological" health. *Journal of Dentistry* 2010;**38** Suppl 1:S21-5.
- 12- Jones H, Newton JT, Bower EJ. A survey of the oral care practices of intensive care nurses. *Intensive & Critical Care Nursing* 2004;**20**(2):69-76.
- 13- Hutchins K, Karras G, Erwin J, Sullivan KL. Ventilator-associated pneumonia and oral care: a successful quality improvement project. *American Journal of Infection Control* 2009;**37**(7):590-7.
- 14- Marsh PD. Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *Journal of Dentistry* 2010 Jun; **38** Suppl 1:S11-5.

- 15- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System. *Critical Care Medicine* 1999; **27**: 887 - 92.
- 16- Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH, Wolff M, Spencer RC, Hemmer M. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *The Journal of American Medical Association* 1995; **274**(8):639-44.
- 17- Niederman MS. The clinical diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Respiratory Care* 2005; **50**(6):788-96; discussion 807-12.
- 18- Genuit T, Bochicchio G, Napolitano LM, McCarter RJ, Roghman MC. Prophylactic chlorhexidine oral rinse decreases ventilator-associated pneumonia in surgical ICU patients. *Surgical Infections* 2001;**2**(1):5-18.
- 19- DeRiso AJ 2nd, Ladowski JS, Dillon TA, Justice JW, Peterson AC. Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest* 1996; **109**(6):1556-61.
- 20- Prendergast V, Kleiman C, King M. The Bedside Oral Exam and the Barrow Oral Care Protocol: translating evidence-based oral care into practice. *Intensive & Critical Care Nursing* 2013; **29**(5):282-90.
- 21- Edwards JR, Peterson KD, Mu Y, Banerjee S, Allen-Bridson K, Morrell G, et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) report: data summary for 2006 through 2008, issued December 2009. *American Journal of Infection Control* 2009; **37**:783-805.
- 22- Berry AM, Davidson PM. Beyond comfort: oral hygiene as a critical nursing activity in the intensive care unit. *Intensive & Critical Care Nursing* 2006 ;**22**(6):318-28.
- 23- Holmstrup P, Poulsen AH, Andersen L, Skuldbøl T, Fiehn NE. Oral infections and systemic diseases. *Dental Clinics of North America* 2003; **47**(3):575-98.
- 24- Feider LL, Mitchell P, Bridges E. Oral care practices for orally intubated critically ill adults. *American Journal of Critical Care* 2010 ;**19**(2):175-83.