

UNIVERSIDADE DE UBERABA
MESTRADO ODONTOLOGIA- CLÍNICA ODONTOLÓGICA INTEGRADA
GABRIELLE LUIZA DE CAMARGOS PESSOA

**DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A PNEUMONIAS EM
AMOSTRAS ORAIS E TRAQUEAIS DE PACIENTES SUBMETIDOS A
VENTILAÇÃO MECÂNICA**

UBERABA, MG

2025

GABRIELLE LUIZA DE CAMARGOS PESSOA

**DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A PNEUMONIAS EM
AMOSTRAS ORAIS E TRAQUEAIS DE PACIENTES SUBMETIDOS A
VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Mestrado acadêmico da Universidade de Uberaba, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica Integrada.

Orientador(a): Prof. Dra. Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins

UBERABA – MG

2025

Catálogo elaborado pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Pessoa, Gabrielle Luiza de Camargos.

P439d Detecção de micro-organismos associados a pneumonias em amostras orais e traqueais de pacientes submetidos a ventilação mecânica / Gabrielle de Camargos Pessoa. – Uberaba, 2025.
53 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Mestrado Acadêmico em Odontologia. Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Ruchele Dias Nogueira.

1. Respiração artificial. 2. Pneumonia. 3. Traquéia – Intubação. I. Nogueira, Ruchele Dias. II. Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Mestrado Acadêmico em Odontologia. Área de Concentração em Clínica Odontológica Integrada. III. Título.

CDD 617.1806

Tatiane da Silva Viana – Bibliotecária – CRB-6/3171

GABRIELLE LUIZA DE CAMARGOS PESSOA

DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A PNEUMONIAS EM AMOSTRAS ORAIS E TRAQUEAIS DE PACIENTES SUBMETIDOS A VENTILAÇÃO MECÂNICA

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Mestrado da Universidade de Uberaba.

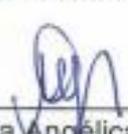
Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada

Aprovado (a) em: 28/02/2025

BANCA EXAMINADORA:



Profª Drª Ruchete Dias Nogueira Geraldo Martins
Orientadora
Universidade de Uberaba



Profª. Drª. Maria Angélica Hueb de Menezes Oliveira
Universidade de Uberaba

gouv.br

Documento assinado digitalmente
PATRICIA ANDRESSA DE ALMEIDA BURANELLO
Data: 05/03/2025 18:29:45 -0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profª. Drª. Patrícia Andressa de Almeida Buranello
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dedico a Deus por me iluminar durante esses dois anos, me dando saúde e determinação, e à minha família, pelo carinho e apoio nessa trajetória, propiciando as condições necessárias para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me guiar em todos os meus passos até aqui.

Agradeço também à minha orientadora Prof. Dra. Ruchele Dias Nogueira, por me orientar desde o início do mestrado, por ter me dado oportunidades de participar de apresentações, seminários e congressos, durante o decorrer do mestrado, pelo estímulo e competente orientação durante a pesquisa. Obrigada pela confiança depositada em mim e por todos os ensinamentos e incentivos ao longo destes anos. Me sinto honrada por ter sido sua aluna durante a graduação, e agora orientanda durante o mestrado.

Agradeço também aos demais mestres e professores que tive ao longo do mestrado, vocês foram extremamente importantes nessa caminhada.

Agradeço a todos os meus colegas de turma em especial minhas amigas Lhorrany e Taynara, vocês foram muito importantes e deixaram essa fase mais leve.

Aos funcionários e colaboradores da universidade e laboratórios, Flávia e Camila em especial, que me auxiliaram sempre que necessário.

Agradeço também a CAPES-(PROSUP) - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela oportunidade de ter sido aluna bolsista.

Agradeço à UNIUBE - Universidade de Uberaba pelo suporte dado ao desenvolvimento dessa dissertação.

E por fim e não menos importante, agradeço também a minha família e noivo, que são meu suporte em tudo e não mediram esforços para me auxiliar nessa trajetória, vocês são peças fundamentais na minha vida e nas minhas conquistas, meu muito obrigada.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

RESUMO

Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão expostos a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos responsáveis por causar graves infecções. Dentre essas infecções está a Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAVM). A principal fonte de contaminação da PAVM é de origem aspirativa, representando um sério problema nas UTIs, prolongando o tempo de internação e aumentando as chances de óbito do paciente. A etiologia da infecção é variada e há fortes evidências de que a microbiota do biofilme oral e condição bucal podem estar associadas ao desenvolvimento da PAVM. Os objetivos foram o de detectar e comparar presença de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* entre amostras salivares e traqueais de pacientes com indicação de intubação. Para tanto, amostras bucais (S) e traqueais (T) foram coletadas no dia (S1 e T1) e após 48 horas (S2 e T2) da intubação. O material genético foi extraído e primers específicos utilizados para detecção em PCR em tempo real. Os resultados mostraram que houve uma correlação positiva entre ter ou não detecção de *S. aureus* tanto entre as amostras e quanto nos dois momentos de coleta ($p < 0.05$). A correlação positiva da presença ou não de *K. pneumoniae* nas duas amostras ocorreu apenas na primeira coleta ($p < 0.05$). Já a detecção de *S. pneumoniae* esteve correlacionada entre as amostras S1 e T2 ($p < 0.05$). Não houve diferenças estatística entre médias de fluorescência para *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ($p > 0.05$). No entanto, a intensidade de detecção de *K. pneumoniae* foram superiores em amostras de T2 diferindo estatisticamente de S2 e T1 ($p < 0.05$). Os resultados permitiram concluir que embora os pacientes não apresentaram sinais clínicos de infecção, 43% das amostras testaram positivas para os microrganismos analisados. Há um frequente intercâmbio de *S. aureus* entre boca e traqueia, tanto antes como após a intubação. A presença de *S. pneumoniae* na boca parece anteceder a sua detecção na traqueia após 48 horas de intubação. *P. aeruginosa* não esteve relacionada entre as amostras e coletas. Já *K. pneumoniae* além de não estar relacionada com as amostras bucais, aumentou cerca 10 vezes mais em amostras traqueais do que nas salivares.

Palavras-chave: Aspiração Respiratória; Biofilme; Intubação; Pneumonia; Respiração artificial.

ABSTRACT

Patients admitted to Intensive Care Units (ICU) are exposed to a wide variety of pathogenic microorganisms responsible for causing severe infections. Among these infections is Ventilator-Associated Pneumonia (VAP). The primary source of VAP contamination is aspirational, representing a serious problem in ICUs by prolonging hospitalization and increasing the likelihood of patient mortality. The etiology of the infection is varied, and there is strong evidence that the microbiota of the oral biofilm and oral condition may be associated with the development of VAP. The objectives were to detect and compare the presence of *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* in saliva and tracheal samples from patients with an indication for intubation. For this, oral (S) and tracheal (T) samples were collected on the day of intubation (S1 and T1) and 48 hours later (S2 and T2). Genetic material was extracted, and specific primers were used for detection in real-time PCR. The results showed a frequent positive correlation between the presence or absence of *S. aureus* in both samples and at both collection times ($p < 0.05$). The positive correlation of *K. pneumoniae* presence or absence between the two samples occurred only in the first collection ($p < 0.05$). The detection of *S. pneumoniae* was correlated between S1 and T2 samples ($p < 0.05$). No statistical differences were found in fluorescence averages for *S. aureus*, *S. pneumoniae*, and *P. aeruginosa* ($p > 0.05$). However, the detection intensity of *K. pneumoniae* was higher in T2 samples, differing statistically from S2 and T1 ($p < 0.05$). The results allowed the conclusion that, although patients did not present clinical signs of infection, 43% of the samples tested positive for the analyzed microorganisms. There is frequent exchange of *S. aureus* between the mouth and trachea, both before and after intubation. The presence of *S. pneumoniae* in the mouth appears to precede its detection in the trachea after 48 hours of intubation. *P. aeruginosa* was not related between the samples and collections. *K. pneumoniae*, besides not being related to the oral samples, increased about 10 times more in tracheal samples than in saliva.

Key-words: Artificial respiration; Biofilm; Intubation; Pneumonia; Respiratory Aspiration.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Detecção positiva e negativa das bactérias nas amostras orais (S) e traqueais (T) nos momentos 1 e 2.....	31
---	----

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1: Primers de oligonucleotídios.....	28
Tabela 2: Representação das amostras positivas bucais e traqueais, negativas dos microrganismos analisados nos momentos 1 e 2.....	30
Gráfico 1: Intensidades de fluorescência emitida pela detecção das bactérias nas amostras orais e traqueais.....	33

LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SÍMBOLOS

PAVM: Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica

UTI: Unidade de Terapia Intensiva

AIDS: Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

PCR: Reação em cadeia da polimerase

CPO-D: Dentes cariados, perdidos e obturados

µL: Microlitros

°C: Graus Celsius

OMS: Organização Mundial de Saúde

TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIUBE: Universidade de Uberaba.

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à metilina

PBS: Phosphate-Buffered Saline

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3 HIPÓTESE.....	19
4 JUSTIFICATIVA.....	20
5 OBJETIVOS.....	21
5.1 Geral.....	21
5.2 Específicos	21
6 CAPÍTULO 1 – Artigo.....	22
6.1 RESUMO.....	23
6.2 INTRODUÇÃO.....	24
6.3 OBJETIVOS.....	25
6.4 MÉTODOS.....	25
6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
6.6 CONCLUSÃO.....	34
6.7 REFERÊNCIAS	35
6.8 AGRADECIMENTOS	38
6.9 CONFLITO DE INTERESSE.....	38
7.CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
ANEXO A-INTRODUÇÃO PARA AUTORES REVISTA EINSTEIN.....	46
ANEXO B- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	48
ANEXO C-TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	49
ANEXO D - FORMULÁRIO DA PESQUISA DADOS CLÍNICOS E PESSOAIS.....	51

1 INTRODUÇÃO

Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão expostos a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos responsáveis por causar graves infecções. Dentre essas infecções está a pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM) cuja incidência aumenta com a duração da Ventilação mecânica (Cabral *et al.*, 2020). A PAVM é definida como a pneumonia que se manifesta entre 48 e 72 horas após a intubação orotraqueal sendo considerada a segunda infecção hospitalar mais comum (De Luca, 2019). Aproximadamente 10% a 20% dos pacientes intubados desenvolvem esta infecção e conseqüentemente, há um aumento do tempo de internação e aproximadamente 33% dos pacientes com PAVM vem a óbito em decorrência direta da infecção (Cabral *et al.*, 2020). O prognóstico muitas vezes não é favorável pelo fato da presença de microrganismos mais resistentes e um hospedeiro com sistema imune mais debilitado (Gomes, 2018).

As bactérias associadas as PAVM são frequentemente multirresistentes a drogas antimicrobianas, o que torna o tratamento mais desafiador. Entre os principais patógenos bacterianos, *Pseudomonas aeruginosa* é uma das principais causas de PAVM, especialmente em pacientes com comorbidades, como doenças pulmonares crônicas, ou em situações de ventilação mecânica prolongada (Charles *et al.*, 2014; Sotgiu *et al.*, 2019). *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), são outra causa importante de PAVM. O MRSA tem sido associado a formas graves de infecção, com altas taxas de mortalidade, especialmente quando o paciente apresenta insuficiência respiratória e sepse concomitante (Aliberty *et al.*, 2016). Bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.*, também são frequentemente isoladas em casos de PAVM. Elas são mais comuns em pacientes com história de uso prolongado de antibióticos, que favorecem o aparecimento de infecções por bactérias resistentes (Van Zeller *et al.*, 2018).

A ventilação mecânica facilita a colonização das vias aéreas inferiores, proporcionando condições ideais para a aspiração de bactérias orais. O tubo endotraqueal, embora essencial para a ventilação, pode permitir a passagem de secreções orofaríngeas

contaminadas com microrganismos para os pulmões. Além disso, a ventilação invasiva prejudica a depuração mucociliar normal, um mecanismo de defesa importante para a

proteção contra infecções pulmonares. A presença do tubo endotraqueal também aumenta o risco de aspiração nasogástrica e microaspiração de secreções gástricas ou orofaríngeas (Özçaka *et al.*, 2017). A principal fonte de contaminação da PAVM é de origem aspirativa, secreções das vias aéreas superiores ocasionam uma resposta inflamatória do hospedeiro contra a multiplicação não controlada de micro-organismos (Elias *et al.*, 2020).

Evidências associam a colonização microbiana da orofaringe e do biofilme dental à PAVM (Morais *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2007). O tubo orotraqueal proporciona uma superfície não descamativa, na qual as bactérias provenientes da mucosa oral podem aderir, colonizar e crescer, formando biofilmes, de onde posteriormente poderão ser broncoaspiradas (Raghavendran *et al.*, 2000). Segundo TUON e colaboradores (2017) a microbiota oral muda após a intubação, de uma predominância de bacilos gram-positivos normais, para uma maior detecção de bacilos gram-negativos associados a PAVM. Estudos sugeriram que a PAVM pode estar associada à colonização microbiana dos dentes placa e orofaringe; no entanto, essas avaliações foram conduzidas com diferentes metodologias e não obteve resultados conclusivos (Scannapieco *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2009).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A pneumonia é uma doença de acometimento global com amplas taxas de morbidade e mortalidade, caracterizada pela infecção pulmonar, na qual microrganismos, atravessam as vias áreas e chegam aos pulmões, ambiente esse que deve estar limpo para que a hematose possa ocorrer, entretanto quando infectado, é colonizado por agentes patógenos provocando alterações pulmonares, que vão se multiplicando e causando uma resposta imune no hospedeiro (Mandell, 2015).

Embora alguns casos se manifestem como uma infecção comum e que muitas vezes passa com sintomas brandos e despercebidos pelos pacientes, existem casos graves e que levam muitos pacientes a óbito. Essa doença, pode ser causada por vários agentes infecciosos, como vírus, fungos e bactérias sendo a forma bacteriana a forma mais comum

dessa doença. Essa infecção faz com os alvéolos fiquem cheios de líquido ou pus, dificultando a respiração e as trocas gasosas (Rodrigues *et al.*, 2016).

Pacientes com leves sintomas e bom estado de saúde muito possivelmente não procuram atendimento por se tratar de sintomas leves. Já pacientes hospitalizados ou com o sistema imune debilitado, muitas vezes ao adquirirem a doença tem uma piora em seu quadro de saúde e quando esse diagnóstico não é feito em tempo hábil muitos pacientes vem a falecer. Além de muitas vezes a pneumonia ser diagnosticada de forma incorreta, nem sempre sendo uma doença notificável o que justifica muitas vezes a dificuldade de se obter dados exatos sobre essa doença (Lanks; Musani; Hsia, 2019).

A transmissão ocorre pelas vias aéreas por gotículas de saliva, secreção respiratória, inalação de aerossóis infectados, disseminação de sangue, ou através de áreas contíguas, infectadas com o microrganismo (Anvisa, 2004).

O agente causador mais comum dessa doença geralmente é o *Streptococcus pneumoniae*, um dos patógenos mais comumente encontrado nos indivíduos com a doença. Apresentações mais graves da doença podem envolver outros microrganismos como *Staphylococcus aureus*, e *Influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* (Atlas da Saúde, 2014).

A pneumonia é uma preocupação significativa no Brasil. De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), essa doença afeta aproximadamente 2,1 milhões de brasileiros, com uma média de 960 mil novos casos por ano. Sendo uma das principais causas de internações hospitalares e ocupa a posição de quinta maior causa de morte no Brasil. Esses números refletem a importância de cuidados básicos com a saúde e a necessidade de rápido diagnóstico e intervenção (Coelho *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2022).

Dentre esses elevados números de óbitos causados por essa doença devemos observar que muitas vezes os pacientes, que vem a falecer, apresentam características em comum, por terem fatores de risco, como idade avançada ou reduzida, etilismo, tabagismo, problemas respiratórios pré-existentes, doenças pulmonares obstrutivas, cardiopatas, doenças autoimunes (Hespanhol; Barbara, 2020).

De acordo com a Diretriz Nacional Brasileira de 2007, a pneumonia se divide entre: Adquirida Na comunidade, Adquiridas no Hospital e Associadas à ventilação Mecânica (Amaral; Cortês; Pires, 2009). A pneumonia adquirida na comunidade é aquela em que o indivíduo adquire a doença fora do ambiente hospitalar, constituindo um dos maiores fatores causadores de morte no mundo e tendo como principal patógeno o *Streptococcus pneumoniae* (Corrêa *et al.*, 2018).

A pneumonia adquirida no ambiente hospitalar geralmente é aquela na qual o paciente não apresentava a infecção no momento da internação, geralmente vindo a ocorrer em até 48 horas após a hospitalização e é causada por patógenos mais virulentos e mais resistentes a antibióticos, como bacilos gram negativos, o que é uma preocupação quando se visa um tratamento para a doença. O prognóstico muitas vezes não é favorável pelo fato da presença de microrganismos mais resistentes e um hospedeiro com sistema imune mais debilitado (Gomes, 2018). Já a PAVM, se assemelha a pneumonia adquirida no hospital, sendo considerada um subconjunto dela, envolvendo normalmente, patógenos resistentes provenientes do tubo orotraqueal. Acontece em pacientes debilitados, que estão intubados, e ocorre, geralmente após 48 a 72 horas da intubação (Kalil *et al.*, 2016).

Na ventilação mecânica um respirador é conectado ao paciente por meio de um tubo que se estende da traqueia até bem próximo aos pulmões. Esse aparelho é responsável por fornecer oxigênio e eliminar o gás carbônico, realizando as trocas gasosas necessárias para o organismo do indivíduo (Fontela *et al.*, 2017). Servindo de suporte para pacientes com insuficiências respiratórias, essa ventilação artificial insufla as vias respiratórias com volumes de ar, se assemelhando a respiração normal do paciente, por meio de um tubo ou uma cânula de traqueostomia ou na forma menos invasiva uma máscara como interface entre o ventilador artificial e o paciente (Carvalho; Toufen Junior; Franca, 2007). O respirador contém um balonete, que evita a aspiração de grandes volumes de secreções (De Souza; Santana, 2012). Entretanto, não é totalmente hermético e existem alguns microrganismos capazes de chegar ao balonete e colonizar o seu interior (Oliveira; Zagalo; Cavaco-silva, 2014).

A PAVM aumenta sua incidência de acordo com duração da Ventilação mecânica (Oliveira *et al.*, 2007). Uma porcentagem significativa dos pacientes intubados desenvolve essas infecções, o que leva ao prolongamento do tempo de internação, gerando mais custos com saúde, aumento direto das chances de óbito devido às complicações relacionadas a infecção (Fourrier *et al.*, 1998). Uma vez que esses pacientes se encontram num estado mais crítico, devido a doença base e o tubo endotraqueal utilizado na ventilação mecânica, diversos dos mecanismos de defesa como o reflexo da tosse, produção de muco, a depuração mucociliar, a lactoferrina, a membrana basal e o sistema imunitário podem estar comprometidos o que facilita ainda mais a colonização por parte dos agentes patogênicos (Oliveira; Zagalo; Cavaco-silva, 2014).

O trato respiratório inferior é protegido por um extenso sistema de defesa, e, para que a doença ocorra, microrganismos altamente virulentos, devem se instalar em quantidade suficiente, enquanto os mecanismos de defesa do hospedeiro geralmente estão comprometidos (Mceachern; Campbell, 1998).

Os microrganismos conseguem alcançar o trato respiratório inferior de duas formas, por difusão hematogênica e ou aspiração. Levando em consideração a aspiração, esses patógenos podem chegar ao trato respiratório inferior, através do conteúdo da orofaringe, inalação de aerossóis infectados, e por meio da disseminação da infecção por vias aéreas contíguas (Johnson; Hirsch, 2003).

A PAVM de início precoce, que ocorre nos primeiros quatro dias da ventilação mecânica (VM), geralmente é causada por bactérias sensíveis a antibióticos, como *Haemophilus e Streptococcus*. A PAVM que se desenvolve mais de 5 dias após o início da ventilação mecânica, geralmente é causada por bactérias resistentes a múltiplos medicamentos, como *Pseudomonas aeruginosa* (Charles *et al.*, 2014).

Estudos mostram que o tubo orotraqueal, pode ser colonizado por microrganismos, que conseguem formar uma camada de biofilme, uma vez que a superfície desse tubo não é descamativa e esses mesmos microrganismos podem ser bronco aspirado (Tuon *et al.*, 2017). Evidências correlacionam a colonização da orofaringe com a colonização bucal, sendo que o tubo tem uma conexão direta da boca aos pulmões (Scannapieco *et al.*, 2003, El-Solh *et al.*, 2004, Oliveira *et al.*, 2007; Raghavendran *et al.*, 2007; Amaral *et al.*, 2009).

Amostras orais coletadas de pacientes internados na UTI mostraram a presença de bactérias fortemente associadas a infecções respiratórias em essas bactérias puderam ser identificadas no biofilme língua respirador simultaneamente (Dung *et al.*, 2024).

A higiene oral tem o objetivo de prevenir infecções e promover o conforto do paciente, ela é imprescindível para remoção e, principalmente, para prevenção da formação do biofilme (Rabello; Araújo; Magalhães 2018). A condição de saúde bucal está diretamente ligada a condição de saúde geral do paciente; focos de infecção ativos orais, como raízes residuais dentárias, gengivites podem exacerbar patologias de base comprometendo o prognóstico do paciente além de ocasionar bacteremia transitória e sepsis em pacientes imunossuprimidos ou debilitados (Vilela *et al.*, 2015).

Os cuidados bucais têm demonstrado resultados positivos quanto a redução na taxa de incidência de PAVM, principalmente em relação ao uso de Clorexidina 0,12%

durante o processo de higienização oral (Beraldo; Andrade, 2008). Diante disso, torna-se essencial avaliar a condição oral de pacientes intubados, investigando a relação entre as bactérias da cavidade oral e as bactérias presentes no aspirado traqueal. Espera-se que este estudo contribua significativamente no que muito ainda pode ser estudado para o avanço no entendimento da pneumonia, tanto com relação aos microrganismos presentes, quanto na relação bucal e traqueal, auxiliando no desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficazes de diagnóstico, tratamento e prevenção.

3. HIPÓTESE

Hipótese:

A colonização traqueal por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes intubados pode ter origem da cavidade bucal.

4. JUSTIFICATIVA

O presente trabalho traz uma contribuição importante para o entendimento da colonização oral e traqueal pelas bactérias *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, antes e após as primeiras 48/72 horas de intubação. E permite correlacionar a presença destes micro-organismos causadores de pneumonia em amostras de saliva e traqueais. Sabendo-se que a pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM) acomete uma grande porcentagem dos pacientes intubados, medidas de prevenção, como cuidados de higiene bucal e procedimentos de antissepsia podem ser eficazes se aplicadas de forma precoce, evitando assim, a transferência das bactérias orais para o tubo do respirador.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral:

Detectar e comparar a presença de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de saliva e traqueia de pacientes intubados na UTI do Hospital Regional de Uberaba.

5.2 Objetivos específicos incluíram:

- Avaliação e comparação da presença dos patógenos nas amostras;
- Comparação locais de presença desses patógenos entre cada bactéria.
- Da detecção das bactérias de acordo com o dia da coleta;

**6. CAPÍTULO 1 – ARTIGO CIENTÍFICO REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS
E BIOLÓGICAS– (ANEXO A)**

**DETECÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS ASSOCIADOS A PNEUMONIAS EM
AMOSTRAS ORAIS E TRAQUEAIS DE PACIENTES SUBMETIDOS A
VENTILAÇÃO MECÂNICA.**

*DETECTION OF MICROORGANISMS ASSOCIATED WITH PNEUMONIA IN ORAL
AND TRACHEAL SAMPLES FROM PATIENTS SUBJECT TO MECHANICAL
VENTILATION.*

Gabrielle Luiza de Camargos Pessoa¹, Ana Maria Schroden Rodrigues da Cunha²,
Leticia Schroden Rodrigues da Cunha³, Vinicius Rangel Geraldo-Martins⁴, Ruchele
Dias Nogueira⁵

¹Cirurgiã-Dentista, Mestranda em clinica Odontológica Integrada pela universidade de
Uberaba (UNIUBE); ²Cirurgiã-Dentista Mestre e Docente-Odontologia pela
universidade de Uberaba (UNIUBE); ³Discente em Medicina pela universidade de
Uberaba (UNIUBE); ⁴Cirurgião-Dentista Pós-Doutor e docente na universidade de
Uberaba (UNIUBE); ⁵Cirurgiã Dentista Pós-Doutor e docente na universidade de
Uberaba (UNIUBE);

Gabrielle Luiza de Camargos Pessoa
Universidade de Uberaba
Uberaba - Minas Gerais – Brasil Telefone: (34) 988379976
e-mail: gabyLuiza28@hotmail.com

Ruchele Dias Nogueira
Universidade de Uberaba
Av. Nenê Sabino, 1801 - Bairro Universitário CEP: 38.055-500
Uberaba - Minas Gerais – Brasil Telefone: (34) 3319-8800
e-mail: ruchele_nogueira@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivos: Detectar e comparar presença de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* entre amostras salivares e traqueais de pacientes com indicação de intubação.

Métodos: Amostras bucais (S) e traqueais (T) foram coletadas no dia (S1 e T1) e após 48 horas (S2 e T2) da intubação. O material genético foi extraído e primers específicos utilizados para detecção em PCR em tempo real.

Resultados: Houve uma frequente correlação positiva entre ter ou não detecção de *S. aureus* tanto entre as amostras e quanto nos dois momentos de coleta ($p < 0.05$). A correlação positiva da presença ou não de *K. pneumoniae* nas duas amostras ocorreu apenas na primeira coleta ($p < 0.05$). Já a detecção de *S. pneumoniae* esteve correlacionada entre as amostras S1 e T2 ($p < 0.05$). Não houve diferenças estatística entre médias de fluorescência para *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ($p > 0.05$). No entanto, a intensidade de detecção de *K. pneumoniae* foram superiores em amostras de T2 diferindo estatisticamente de S2 e T1 ($p < 0.05$).

Conclusões: Embora os pacientes não apresentaram sinais clínicos de infecção, 43% das amostras testaram positivas para os microrganismos analisados. Há um frequente intercâmbio de *S. aureus* entre boca e traqueia, tanto antes como após a entubação. A presença de *S. pneumoniae* na boca parece anteceder a sua detecção na traqueia após 48 horas de entubação. *P. aeruginosa* não esteve relacionada entre as amostras e coletas. Já *K. pneumoniae* além de não estar relacionada com as amostras bucais, aumentou cerca 10 vezes em amostras traqueais do que nas salivares.

Palavras-chave: Aspiração Respiratória; Biofilme; Intubação; Pneumonia; Respiração artificial.

INTRODUÇÃO

Pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) estão expostos a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos responsáveis por causar graves infecções. Dentre essas infecções está a pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM) cuja incidência aumenta com a duração da Ventilação mecânica ⁽¹⁾. A PAVM é definida como a pneumonia que se manifesta entre 48 e 72 horas após a intubação orotraqueal sendo considerada a segunda infecção hospitalar mais comum ⁽²⁾. Aproximadamente 10% a 20% dos pacientes intubados desenvolvem esta infecção e consequentemente, há um aumento do tempo de internação e aproximadamente 33% dos pacientes com PAVM vem a óbito em decorrência direta da infecção ⁽¹⁾. O prognóstico muitas vezes não é favorável pelo fato da presença de microrganismos mais resistentes e um hospedeiro com sistema imune mais debilitado ⁽³⁾

As bactérias associadas as PAVM são frequentemente multirresistentes a drogas antimicrobianas, o que torna o tratamento mais desafiador. Entre os principais patógenos bacterianos, *Pseudomonas aeruginosa* é uma das principais causas de PAVM, especialmente em pacientes com comorbidades, como doenças pulmonares crônicas, ou em situações de ventilação mecânica prolongada ^(4,5). *Staphylococcus aureus*, incluindo cepas MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à meticilina), é outra causa importante de PAVM. O MRSA tem sido associado a formas graves de infecção, com altas taxas de mortalidade, especialmente quando o paciente apresenta insuficiência respiratória e sepsis concomitante ⁽⁶⁾. Bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.*, também são frequentemente isoladas em casos de PAVM. Elas são mais comuns em pacientes com história de uso prolongado de antibióticos, que favorecem o aparecimento de infecções por bactérias resistentes ⁽⁷⁾.

A ventilação mecânica facilita a colonização das vias aéreas inferiores, proporcionando condições ideais para a aspiração de bactérias orais. O tubo endotraqueal, embora essencial para a ventilação, pode permitir a passagem de secreções orofaríngeas contaminadas com microrganismos para os pulmões. Além disso, a ventilação invasiva prejudica a depuração mucociliar normal, um mecanismo de defesa importante para a proteção contra infecções pulmonares. A presença do tubo endotraqueal também aumenta o risco de aspiração nasogástrica e microaspiração de secreções gástricas ou orofaríngeas ⁽⁸⁾. A principal fonte de contaminação da PAVM é de origem aspirativa, secreções das vias

aéreas superiores ocasionam uma resposta inflamatória do hospedeiro contra a multiplicação não controlada de micro-organismos ⁽⁹⁾.

Evidências associam a colonização microbiana da orofaringe e do biofilme dental à PAVM ^(10,11). O tubo orotraqueal proporciona uma superfície não descamativa, na qual as bactérias provenientes da mucosa oral podem aderir, colonizar e crescer, formando biofilmes, de onde posteriormente poderão ser bronco aspiradas ⁽¹²⁾. Segundo Tuon e colaboradores (2017) ⁽¹³⁾ a microbiota oral muda após a intubação, de uma predominância de bacilos gram-positivos normais, para uma maior detecção de bacilos gram-negativos associados a PAVM. Estudos sugeriram que a PAVM pode estar associada à colonização microbiana dos dentes placa e orofaringe; no entanto, essas avaliações foram conduzidas com diferentes metodologias e não obteve resultados conclusivos ^(10,14,15).

OBJETIVOS

Detectar e comparar a presença de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* em amostras bucais e traqueais de pacientes internados na UTI do Hospital Regional de Uberaba, no dia da intubação e após 48 horas.

MÉTODOS

Delineamento do Estudo e coletas amostrais

O presente estudo caracteriza-se como um estudo analítico observacional, trata-se de uma investigação cuja originalidade é primária. Este protocolo de pesquisa foi submetido para apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Uberaba – UNIUBE (76451423.0.0000.5145) (Anexo B). Envolveu a participação de voluntários atendidos pela Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Regional de Uberaba (UTI). Os voluntários ou responsáveis tomaram conhecimento do estudo, deram concordância em participar e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo C), foi garantido o direito de interrupção e esclarecimentos sobre o estudo a qualquer momento, o acesso aos resultados dos exames clínicos e

complementares, o sigilo sobre os mesmos, garantindo integridade, privacidade dos envolvidos.

Foram realizadas as coletas amostrais, exames clínicos intra-orais e informações socioeconômicas e de saúde através do prontuário do paciente e questionário (Anexo D). Apenas pacientes intubados com secreção traqueal foram incluídos. Foram excluídos os pacientes que apresentaram: episódios prévios de aspiração de conteúdo gástrico, aqueles que se submeteram à cirurgia torácica recente, tinham doença pulmonar obstrutiva, infecções pulmonares ou estavam em uso de antibióticos. Um total de 21 pacientes elegíveis foram submetidos as coletas na admissão (coleta 1) e após 48 horas da intubação (coleta 2).

As coletas orais foram realizadas com swab estéril que foi esfregado na boca do paciente e embebido na saliva por 1 minuto, obtendo-se duas amostras: S1 – swab oral da coleta 1 e S2 – swab oral da coleta 2. As amostras de secreção traqueal (T1 – swab traqueal da coleta 1 e T2 – swab traqueal da coleta 2) foram obtidas com swab estéril que foi esfregado na extremidade do cateter de sucção do conteúdo traqueal. Esses swabs foram imersos em tubos com 1ml de solução tampão de PBS, devidamente identificado com as iniciais do paciente, data da coleta e qual a região e posteriormente enviados para o laboratório de microbiologia da Uniube, no qual ficaram armazenadas no freezer -70°C até o momento da análise.

Após as coletas foi realizado um exame clínico intraoral, em seguida, a equipe de saúde bucal, realizou a higiene oral com utilização de antisséptico bucal, sonda de sucção e proteção labial com 5% de dexpanthenol creme (Anexo D). As coletas foram realizadas pela equipe de saúde bucal e fisioterapia do hospital e pelos cirurgiões dentistas pesquisadores nesse trabalho. Foi realizado um treinamento de padronização para a realização de todas as coletas.

Extração de DNA

Para detectar as bactérias presentes nas amostras coletadas foram realizadas as extrações de DNA das amostras. Esse processo de extração do DNA cromossomal, foi realizado de acordo com o protocolo do fabricante, do kit PureLink Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™). Foram feitas preparações, acrescentando etanol 100% ao tampão de lavagem 1 e 2, enquanto o banho maria foi ligado a 55°C. A primeira etapa da extração de DNA consiste na lise. 200µL das amostras foram retiradas do tubo de coleta estéril

com o swab e passadas para um eppendorf estéril, utilizando 200 µL da amostra. Nesses 200 µL da amostra foram adicionados 20µL de proteinase K, mais um volume de 500µL de Pure Link Genomic Lysis/Binding Buffer, em sequência foi misturado bem e levado ao vórtex. Após isso, esse material foi levado a incubadora a 55°C por 10 minutos, e passou pela centrifuga para coletar qualquer lisado na tampa dos eppendorfs. Foi adicionado 200µL de etanol 100% ao eppendorf e passou ao vórtex por 5 segundos obtendo uma solução homogênea. Na continuidade para purificação e ligação do DNA, foi colocado 640µL da amostra preparada até o momento no eppendorf Spin Column fornecido pelo kit Purelink. Que passou pela centrifuga a 10.000x g por 1 minuto em temperatura ambiente. Foi descartado o tubo de coleta e a coluna de centrifugação foi colocada em um eppendorf de coleta novo e estéril.

À lavagem do DNA foi adicionada 500µL do tampão de lavagem 1 preparado antes com etanol. O eppendorf foi levado para à centrifuga a 10.000x g por 1 minuto em temperatura ambiente. O tubo foi novamente descartado e a coluna colocada em um novo eppendorf fornecido pelo kit. Adicionamos 500µL do tampão de lavagem 2 e a coluna passou pela centrifuga na velocidade máxima por 3 minutos em temperatura ambiente, e após isso o eppendorf foi descartado.

Para a eluição etapa final do processo a coluna foi colocada em um eppendorf de 1,5 ml estéril, foi adicionado 100µL de PureLink Genomic Elution Buffer à coluna e centrifugado na velocidade máxima por 1 minuto em temperatura ambiente. Após a centrifugação a coluna de filtro foi descartada e no eppendorf restou o DNA purificado pronto para análise e PCR.

PCR em Tempo Real

Para realização do PCR em tempo real foi utilizado o kit SYBR-PCR (Quantinova) e foram utilizados primers de oligonucleotídios para amplificar pares de base de DNA da sequência (Tabela 1). Os primers foram dissolvidos em solução tampão de TE 1X [10 mM Tris-HCl/ EDTA 1mM (pH 7,5-8,0)].

Tabela 1: Primers de oligonucleotídios

Primers	Sequência 5' - 3'
Universal F R	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
	TGCGGGACTTAACCCAACA
<i>S. aureus</i> F R	AACAGTATATAGTGCAACTTCAA
	CTTTGTCAAACCTCGACTTCAA
<i>S. pneumoniae</i> F R	CACTCAACTGGGAATCCGC
	CCAGGCACCATTATCAACAGG
<i>P. aeruginosa</i> F R	GTTTCGGCCTGTTGCCTAAG
	AACTCGTGCTGCTTTTCGC
<i>K. pneumoniae</i> F R	TACACAATCGCCCGTTGAAC
	CCCGGTTAGATCCATGGTGA

As reações dos poços foram realizadas com 4µL das amostras, 10 µL do SYBR, 1ul do Primer R, 1 ul primer F e 4 µL de água ultrapura em cada um dos 84 poços. As placas foram identificadas, seladas, levadas à centrifugas e inseridas no termociclador que realiza o PCR para leitura. O programa StepOne foi ajustado em 40 ciclos, 95°C por 3 minutos para a fase de desnaturação, o anelamento a 58°C por 30 segundos e o processo de extensão eleva a temperatura até 72°C por 30 segundos.

Para obtenção de resultados, ocorre a emissão de um sinal de fluorescência esse aumento da fluorescência ao longo da amplificação do produto gera uma curva que representam a especificidade da reação chamada curva de dissociação. Os sinais de fluorescência emitidos a medida que o produto é amplificado permitiram esse acompanhamento em tempo real, da detecção do material genético bacteriano que estavam procurando na análise.

Análise dos dados

Os resultados foram tabulados em planilha Excel e posteriormente analisados pela estatística BioEstat software versão 5.3 (Optical Digital Technology, Belém, PE, Brasil). A estatística descritiva foi inicialmente realizada fornecendo frequências absolutas e relativas. O teste Exato de Fisher e o Qui-quadrado foi utilizado para verificar a associação de um patógeno nos diferentes locais de coleta e tempos. As variações de espécies microbianas de acordo com o local da coleta foram analisadas através da análise

de correlação de Pearson e teste de variância. Foi considerado significativo o valor de $p < 0.05$.

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram coletadas amostras (S e T) de 49 pacientes com indicação de intubação na UTI do Hospital Regional de Uberaba, sendo 25 do sexo Feminino (F) e 24 do masculino (M). Destes pacientes, 28 pacientes não puderam participar da análise prospectiva por várias razões, dentre elas: a extubação em menos de 24 horas, óbitos, instabilidade no dia da coleta, e desistência de participação. Desta maneira, o estudo foi realizado com 21 pacientes (11 M e 10 F), com média de 70,7 (DP: 12.5) anos de idade. Nenhum destes pacientes elegíveis apresentou sinais de pneumonia ou sinais clínicos de infecção durante os momentos das coletas e não foi avaliado o desenvolvimento de pneumonia após o término das coletas. Nas amostras obtidas destes pacientes foram realizados ensaios de PCR para detecção de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, que são microrganismos frequentemente relacionados ao desenvolvimento de pneumonias em intubação traqueal ^(10,16). A tabela 2 representa a frequência de amostras que foram positivas e negativas para a detecção dos micro-organismos analisados. A análise estatística mostrou que não houve diferenças estatisticamente significante na detecção ou não das bactérias, tanto entre as datas das coletas e amostras ($p > 0.09$, $q < 1,56$).

Tabela 2: Representação das amostras positivas/ negativas bucais e traqueais, dos micro-organismos analisados nos momentos 1 e 2.

Bacteria	Detecção	S1	S2	T1	T2
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
<i>S. aureus</i>	positivas	10 (48)	9 (43)	10 (48)	11 (52)
	negativas	11 (52)	12 (57)	11 (52)	10 (48)
<i>K. pneumoniae</i>	positivas	13 (62)	10 (48)	10 (48)	12 (57)
	negativas	8 (38)	11 (52)	11 (52)	9 (43)
<i>S. pneumoniae</i>	positivas	14 (67)	13 (62)	10 (48)	10 (48)
	negativas	7 (33)	8 (38)	11 (52)	11 (52)
<i>P. aeruginosa</i>	positivas	11 (52)	14 (67)	11 (52)	10 (48)
	negativas	10 (48)	7 (33)	10 (48)	11 (52)

Embora os pacientes não tenham apresentado sinais e sintomas das infecções pelos micro-organismos, mais de 43% dos pacientes apresentaram as bactérias nas amostras traqueais e salivares, tanto na primeira coleta como após a segunda coleta. Interessantemente as bactérias foram detectadas na maioria das amostras salivares na primeira coleta. Com exceção da *P. aeruginosa*, que aumentou os níveis de detecção nas amostras orais da primeira para a segunda coleta, as demais bactérias tiveram uma diminuição na detecção. O que corrobora com estudos que mostraram que mesmo que na admissão, os pacientes tenham dado entrada, com condições bucais desfavoráveis, os cuidados da equipe de saúde bucal da UTI possibilitaram uma estabilização dos níveis microbianos, como encontrado por Saensom *et al.* (2016),⁽¹⁷⁾ em que os autores afirmaram que a higiene oral dos pacientes de UTI pode reduzir os níveis detectáveis de bactérias. Segundo Franco e colaboradores (2014)⁽¹⁸⁾ a higienização oral tem eficácia na redução da taxa de microrganismos da microbiota oral de pacientes hospitalizados.

A figura 1 abaixo representa a detecção positiva (coloridas) e negativa (brancas) das bactérias nas amostras orais (S1/S2) e traqueias (T1/T2) nos 21 pacientes, nos dois momentos das coletas.

Figura 1: Detecção positiva e negativa das bactérias nas amostras orais (S) e traqueais (T) nos momentos 1 e 2.

Paciente	<i>S. aureus</i>				<i>K. pneumoniae</i>				<i>S. pneumoniae</i>				<i>P. aeruginosa</i>			
	S1	T1	S2	T2	S1	T1	S2	T2	S1	T1	S2	T2	S1	T1	S2	T2
1																
2	■		■	■	■			■		■			■			
3					■	■	■	■	■	■						
4			■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	■	■
5		■			■	■	■	■		■	■			■	■	
6					■	■	■			■			■			
7	■	■	■	■						■	■			■	■	■
8										■	■	■	■	■	■	■
9				■				■		■	■	■	■	■	■	■
10	■	■	■	■	■	■		■		■	■	■	■	■	■	■
11	■	■		■	■	■				■	■	■	■	■	■	■
12	■	■	■	■	■	■	■	■								
13			■	■				■				■				
14	■	■	■			■	■	■	■	■	■			■	■	
15	■	■	■	■	■	■	■	■								
16					■			■		■		■	■	■	■	■
17	■				■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
18	■	■	■	■	■	■		■		■	■					
19	■	■								■						
20				■			■				■			■	■	
21		■			■	■	■			■				■		

A análise detecção ou não de *S. aureus* entre as amostras salivares e traqueais (figura 1) mostrou que, 8 pacientes tiveram a bactéria e outros 8 pacientes não tiveram a bactéria, em ambas as amostras, o que determinou uma correlação positiva entre ter ou não *S. aureus* detectado nas amostras salivares e traqueais, tanto na primeira, como na segunda coleta ($p=0.0028$, $r=0.61$; $p=0.0021$, $r=0.63$). Também houve uma correlação positiva entre ter positivo ou não para *S. aureus* entre as amostras S1 e S2 ($p=0.01$, $r=0.52$), já que 7 pacientes tiveram a bactéria em S1 e S2, e 8 não apresentaram a bactéria nestas amostras, o que não aconteceu entre as amostras traqueais ($p=0.59$, $r=0.14$).

Para *K. pneumoniae* houve correlação positiva entre de ter ou não a detecção, somente na primeira coleta ($p=0.009$, $r=0.55$), já que 9 pacientes tiveram a detecção e 7

não apresentaram a bactéria nas duas amostras (S1 e T1). Não foram encontradas outras correlações entre S1, S2, T1 e T2 para *K. pneumoniae* ($p>0.11$, $r>0.05$).

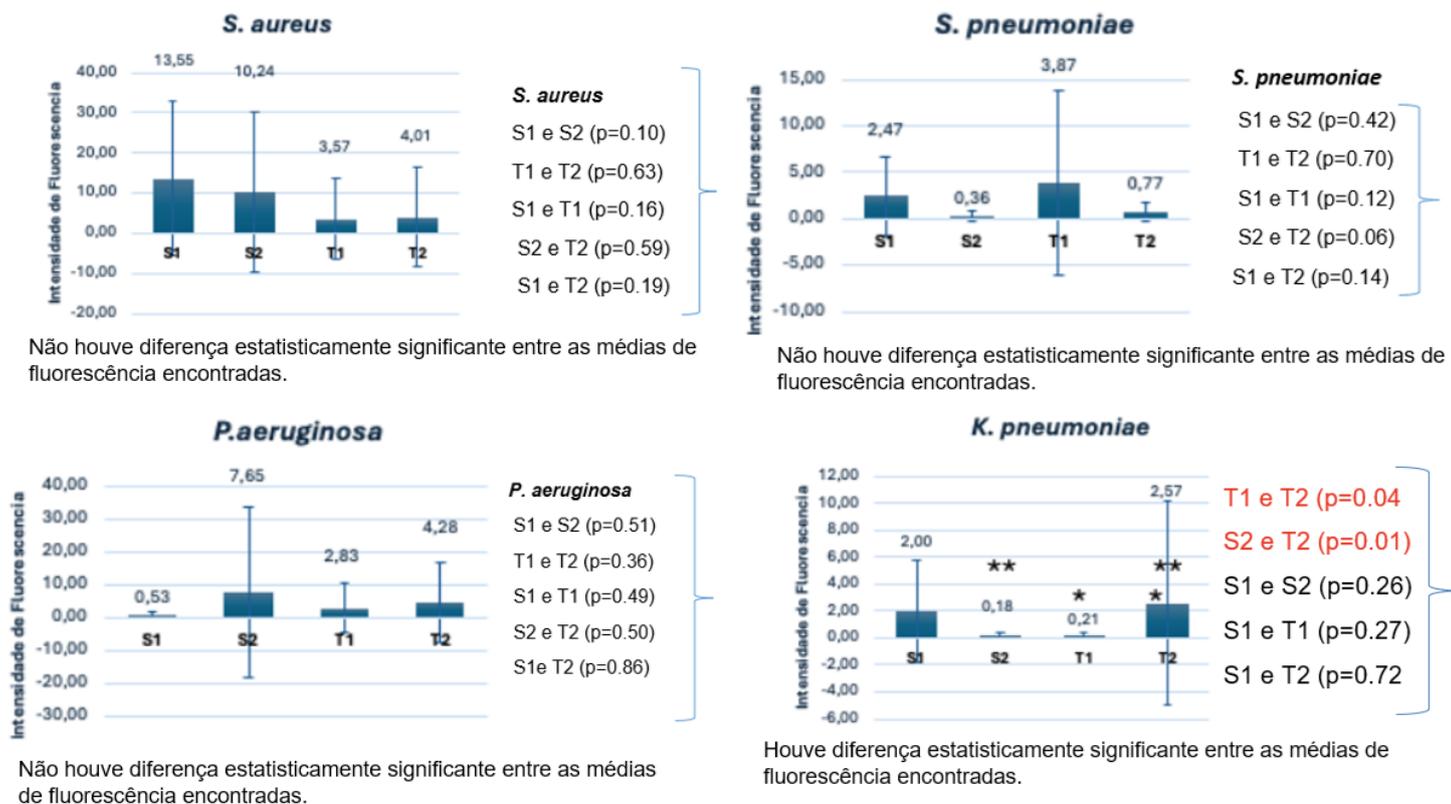
Não foram encontradas outras correlações positivas para detecção ou não de *P. aeruginosa* e *S. pneumoniae*, entre as amostras e coletas realizadas (S1, S2, T1 e T2; $p>0.11$, $r>0.05$). A análise de correlação entre ter ou não o micro-organismo detectado em S1 e posteriormente em T2 mostrou que não houve uma correlação para *S. aureus* ($p=0.13$, $r=0.33$), *K. pneumoniae* ($p=0.16$, $r=0.31$) e *P. aeruginosa* ($p=0.13$, $r=0.33$)

Amostras orais de pacientes internados na UTI apresentaram bactérias fortemente ligadas a infecções respiratórias, tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Kleibella pneumoniae* ⁽¹⁰⁾. Nesses pacientes, 70% destas bactérias constavam no biofilme oral: 63,33% na língua, 73,33% no respirador artificial e 43,33% em todas as outras áreas, simultaneamente, demonstrando que o biofilme oral desses pacientes serviria de reservatório para micro-organismos associados a pneumonia nosocomial ^(10,19). Aqui, dentre os micro-organismos analisados *S. aureus* e *K. pneumoniae* tiveram correlação entre as amostras, especialmente na primeira coleta. Um estudo de Souza e colaboradores em (2015) ⁽²⁰⁾ mostrou que quase 60% dos pacientes intubados na UTI apresentaram as mesmas espécies de patógenos em seu aspirado traqueal e no biofilme oral coletado na língua, dos quais, 42,1% desenvolveram PAVM, 52,63% não desenvolveram pneumonia.

Streptococcus pneumoniae, uma bactéria comum na microbiota oral, é uma das principais responsáveis por infecções respiratórias, incluindo PAVM. Em pacientes com ventilação mecânica, a aspiração das secreções orais pode levar a uma colonização pulmonar, promovendo o desenvolvimento de pneumonia ⁽²¹⁾. Houve uma correlação significativa quando *S. pneumoniae* foi analisada, já que, 6 pacientes não tiveram detecção da bactéria em S1 e T2, enquanto 9 tiveram nas duas amostras ($p=0.03$, $r=0.47$). Uma revisão da literatura mostrou que 70% das bactérias presentes no biofilme do tubo são orais. ⁽¹⁹⁾

O (Gráfico 1) mostra a intensidade de fluorescência emitidas pela detecção das bactérias nas amostras orais e traqueais.

Gráfico 1: Intensidade de fluorescência emitidas pela detecção das bactérias nas amostras orais e traqueais.



Os gráficos acima, mostram uma comparação e avaliação da significância entre as médias de intensidade de fluorescência emitida durante o processo da reação em cadeia da polimerase. Essa intensidade é determinada como a quantidade de luz que é emitida pelo syber de fluorescência usado durante a reação, que é proporcional a amplificação do DNA. Quanto maior a curva de fluorescência, mais material genético está sendo amplificado no processo do PCR. Entretanto ao compararmos não houve diferenças estatisticamente significantes entre as médias de fluorescência encontradas para *S. aureus* entre S1 e S2 (p=0.10), T1 e T2 (p=0.63), S1 e T1 (p=0.16), S2 e T2 (p=0.59) e S1 e T2 (p=0.19). Também não houve diferenças estatisticamente significantes tanto para *S. pneumoniae* entre S1 e S2 (p=0.42), T1 e T2 (p=0.70), S1 e T1 (p=0.12), S2 e T2 (p=0.06) e S1 e T2 (p=0.14), quanto para *P. aeruginosa* entre S1 e S2 (p=0.51), T1 e T2 (p=0.36), S1 e T1 (p=0.49), S2 e T2 (p=0.50) e S1 e T2 (p=0.86). Por outro lado, houve diferenças estatisticamente significantes entre as médias de fluorescência encontradas para *K. pneumoniae* entre T1 e T2 (p=0.04) e S2 e T2 (p=0.01), o que não aconteceu entre S1 e S2 (p=0.26), S1 e T1 (p=0.27) e S1 e T2 (p=0.72).

Diante dos resultados, o papel das bactérias orais no desenvolvimento da PAVM precisa ser amplamente estudado, pois essas bactérias podem ser aspiradas durante a ventilação e contribuir para a infecção nos pulmões ⁽²²⁾. As bactérias orais podem se proliferar rapidamente quando o paciente está intubado, devido à redução da salivagem, à alteração da deglutição e à presença de dispositivos invasivos, como os tubos endotraqueais ⁽²³⁾. Medidas de prevenção contra o desenvolvimento de PAVM são necessárias, para diminuir, o índice de pacientes acometidos, o uso de medicamentos como antibióticos, a permanência desses pacientes internados e as taxas de mortalidade associadas ⁽²⁴⁾. Há um consenso, de que a falta de higiene oral do paciente entubado, seja um fator de risco importante para o desenvolvimento da PAVM ⁽²⁵⁾. A higiene oral tem o objetivo de prevenir infecções e promover o conforto do paciente, ela é imprescindível para remoção e, principalmente, para prevenção da formação do biofilme ⁽²⁶⁾. Os cuidados bucais têm demonstrado resultados positivos quanto a redução na taxa de incidência de PAVM, principalmente em relação ao uso de Clorexidina 0,12% durante o processo de higienização oral ^(1,27,28), com realizados durante o acompanhamento do paciente. Isso demonstra como o cirurgião dentista desempenha um papel fundamental no ambiente hospitalar, especialmente em leitos e UTIs, na prevenção de doenças que têm origem na cavidade oral e podem agravar o estado de saúde dos pacientes. A falta de higiene bucal adequada em pacientes hospitalizados, principalmente aqueles em estado crítico, pode levar ao acúmulo de biofilme bacteriano, aumentando o risco de diversas doenças como pneumonia associada à ventilação mecânica, endocardite infecciosa e outras infecções sistêmicas. A atuação do dentista hospitalar na higienização bucal, no manejo de lesões e infecções bucais e na orientação da equipe multiprofissional contribui significativamente para a redução da morbidade e mortalidade, além de melhorar a recuperação dos pacientes e reduzir o tempo de internação ⁽¹⁷⁾.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nesse trabalho, nos permitiram concluir que, mais de 40% das amostras, tanto salivares quanto traqueais tiveram níveis detectáveis das bactérias, sendo que a maioria das amostras salivares apresentou um número maior nas amostras iniciais e uma redução da quantidade microbiana nas amostras secundárias, consideravelmente essa redução pode ser associada realização da higienização oral feita na UTI pela equipe de saúde bucal do hospital, também a presença de *S. pneumoniae*

mostrou uma correlação com a colonização oral na primeira visita e na traqueia após 48/72 horas, mostrando que as bactérias orais estão associadas com a colonização traqueia e possivelmente com o desenvolvimento de pneumonia associada a ventilação mecânica, apesar de neste estudo não ter sido avaliado o diagnóstico de pneumonia, após a intubação.

6.7 REFERÊNCIAS

- 1.Cabral BG, Matos ECO, De Santana ME, Ferreira Júnior AC. Cuidados preventivos para pneumonia associada a ventilação mecânica: revisão integrativa. *Revista Enfermagem Atual In Derme*. 2020 Apr 6;91(29). Available from: <https://doi.org/10.31011/reaid-2020-v.91-n.29-art.542>
- 2.Luca FA. Procedimento operacional padrão (POP) de higiene bucal na prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica – PAVM, em unidade de terapia intensiva: estudo não randomizado, aberto, com avaliador cego [dissertação]. Botucatu: Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2019. 28 p.
- 3.Gomes M. Community-acquired pneumonia: challenges of the situation in Brazil. *Jornal Brasileiro de Pneumologia [Internet]*. 2018 Aug;44(4):254–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37562018000040002>.
- 4.Charles MP. Ventilator-associated pneumonia. *australasian medical journal*. 2014 Aug 31;7(8):334–44.
- 5.Sotgiu G, Saderi L, Petruccioli E, Aliberti S, Piana A, Petrone L, et al. QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Infection [Internet]*. 2019 Nov;79(5):444–53. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.08.018>
- 6.Aliberti S, Reyes LF, Faverio P, Sotgiu G, Dore S, Rodriguez AH, et al. Global initiative for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia (GLIMP): an international, observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016 Dec;16(12):1364–76. Available from: 10.1016/S1473-3099(16)30267-5

7.M. van Zeller, Bastos P, Fernandes G, A. Magalhães. Clinical challenges of persistent pulmonary air-leaks—Case report. *Revista portuguesa de pneumologia*. 2014 May 1;20(3):162–6.

8.Özçaka Ö, Başoğlu OK, Buduneli N, Taşbakan MS, Bacakoğlu F, Kinane DF. Chlorhexidine decreases the risk of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients: a randomized clinical trial. *Journal of periodontal research* [Internet]. 2012;47(5):584–92. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22376026>

9. Elias C de MV, Rocha MO da, Cunha DCL, Araújo A da S, Amaral IN, Marques LL, et al. Evidências científicas sobre prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica: revisão integrativa. *Research, Society and Development*. 2020 Jun 16;9(7):e954975104. Available from: 10.33448/rsd-v9i7.5104

10. Oliveira LCBS de, Carneiro PPM, Fischer RG, Tinoco EMB. A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* [Internet]. 2007 Dec 1;19:428–33. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2007000400004>

11. Morais TMN de, Silva A da, Avi ALR de O, Souza PHR de, Knobel E, Camargo LFA. A importância da atuação odontológica em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*. 2006 Dec;18(4). Available from: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2006000400016>

12. Raghavendran K, Mylotte JM, Scannapieco FA. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. *Periodontology 2000* [Internet]. 2007 Jun;44(1):164–77. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00206.x>

13. Tuon FF, Gavrilko O, Almeida S de, Sumi ER, Alberto T, Rocha JL, et al. Prospective, randomised, controlled study evaluating early modification of oral microbiota following admission to the intensive care unit and oral hygiene with chlorhexidine. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [Internet]. 2017 Mar;8:159–63. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.12.007>

14.Scannapieco FA. Pneumonia in nonambulatory patients: The role of oral bacteria and oral hygiene. *The Journal of the American Dental Association* [Internet]. 2006 Oct 1;137:S21–5. Available from: 10.14219/jada.archive.2006.0400

15. Amaral SM, Cortês A de Q, Pires FR. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* [Internet]. 2009 Nov 1;35(11):1116–24. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001100010>

16. Cairns S, Thomas JG, Hooper SJ, Wise MP, Wilson MJ, Lewis MAO, et al. Molecular analysis of microbial communities in endotracheal tube biofilms. *PLoS ONE*. 2011;6(3):e14759. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014759>

17. Saensom D, Merchant A, Wara-aswapati N, Ruaisungnoen W, Pitiphat W. Oral health and ventilator-associated pneumonia among critically ill patients: a prospective study. *Oral Diseases*. 2016 Jul 29;22(7):709–14. Available from: 10.1111/odi.12535

18. Franco JB, Silva MCS, Oliveira LP, Santos RP. Higiene bucal para pacientes intubados sob ventilação mecânica assistida na unidade de terapia intensiva: proposta de protocolo. *Arq Med Hosp Fac Cienc Med Santa Casa São Paulo*. 2014;59(2):126-131.

19. Carlos A, Gisele Lago Martinez, Alberto Bicudo Salomão, Melissa Guimarães Crepaldi, Alessio E, Henrique L, et al. Perfil microbiológico do biofilme no tubo orotraqueal dos pacientes extubados: Revisão da literatura. *Research, Society and Development*. 2021 Jun 29;10(7):e45010714661-e45010714661.

20. Souza CR, Santana de VTS. Impact of supra-cuff suction on ventilator-associated pneumonia prevention. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* [Internet]. 2012;24(4):401–6. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2012000400018>

21. Needleman IG, Hirsch NP, Leemans M, Moles DR, Wilson M, Ready DR, et al. Randomized controlled trial of toothbrushing to reduce ventilator-associated pneumonia pathogens and dental plaque in a critical care unit. *Journal of Clinical Periodontology*. 2011 Jan 11;38(3):246–52. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01688.x>

22. de R, De C, Diogo Lima Cunha, Carmen D. Estudo dos casos de pneumonia por pneumonia no município de Parnaíba-PÍ. *Brazilian Journal of Development*. 2022 Dec 9;8(12):78404–17.

23. Rodrigues AN, Fragoso LV e C, Beserra F de M, Ramos IC. Impactos e fatores determinantes no bundle de pneumonia associada à ventilação mecânica. *Revista*

Brasileira de Enfermagem. 2016 Dec;69(6):1108–14. Available from: 10.1590/0034-7167-2016-0253

24. Melo MM, Santiago LMM, Nogueira DL, Vasconcelos M de FP. Ventilator-Associated Pneumonia: the Knowledge of Health Professionals Towards Prevention and Educational Measures / Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica: Conhecimento dos Profissionais de Saúde Acerca da Prevenção e Medidas Educativas. Revista de Pesquisa: Cuidado é Fundamental Online. 2019 Jan 21;11(2):377. Available from: <https://doi.org/10.9789/2175-5361.2019.v11i2.377-382>

25. Tereza C, Júlia M, Fraga M, Evelyn, Carlos R, Silva CA, et al. Importância dos cuidados de higiene oral realizados em pacientes intubados no centro de terapia intensiva. 2019 Dec 1;9(51):1933–8.

26. Rabello F, Araújo V, Magalhães S. Effectiveness of oral chlorhexidine for the prevention of nosocomial pneumonia and ventilator-associated pneumonia in intensive care units: Overview of systematic reviews. International Journal of Dental Hygiene. 2018 Feb 23;16(4):441–9. Available from: <https://doi.org/10.1111/idh.12336>

27. Silva GEM, Thomsen LP da R, Lacerda JCT, Botelho SHB, Reis JAC, Ferreira RDDA, et al. Odontologia hospitalar no Brasil: onde estamos? Uma análise do cenário dos últimos anos. Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre. 2020 Aug 20;61(1):94–100. Available from <https://doi.org/10.22456/2177-0018.99716>

28. Vidal CFL. Impacto da higiene oral com clorexidina com e sem escovação dentária na prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica: estudo randomizado [tese de doutorado]. Recife: Universidade Federal de Pernambuco; 2014. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/12053>

6.8 AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)

6.9 CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

7. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados nesse trabalho, permitiram concluir que:

- Mais de 40% das amostras traqueais podem ter níveis detectáveis das bactérias analisadas nos dois momentos de coleta;

- A maioria das amostras salivares apresentaram os micro-organismos em níveis detectáveis, mais no primeiro momento.

- A detecção ou não de *S. aureus* esteve correlacionada entre as amostras e visitas;

- A presença de *S. pneumoniae* na saliva na primeira visita esteve correlacionada com a detecção na traqueia após 48 horas;

- *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* puderam ser detectadas em amostras salivares, mas não estiveram correlacionadas com a detecção traqueal;

- A quantidade de *K. pneumoniae* foi mais de 10 vezes superior nas amostras traqueais do que nas salivares.

REFERÊNCIAS

ALIBERTI, S. et al. Global initiative for meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia (GLIMP): an international, observational cohort study. **The Lancet infectious diseases**, v. 16, n. 12, p. 1364–1376, 2016. [10.1016/S1473-3099\(16\)30267-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30267-5)

AMARAL, S. M.; CORTÊS, A. DE Q.; PIRES, F. R. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 35, n. 11, p. 1116–1124, 2009. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132009001100010>

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Edição Comemorativa para o IX Congresso ISSN 2675-5025 - **REVISTA RECIFAQUI**, V. 3, N. 11, 2021 144.

Disponível em:

<https://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_microbiologia_completo.pdf>.

Acesso em: 11 nov. 2024.

ATLAS DA SAÚDE. Os diferentes tipos de pneumonia. Disponível em:

<<https://www.atlasdasaude.pt/publico/content/os-diferentes-tipos-de-pneumonia>>.

Acesso em: 11 nov. 2024.

BERALDO, C. C.; ANDRADE, D. DE. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 34, n. 9, p. 707–714, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132008000900012>

CABRAL, B. G. et al. Cuidados preventivos para pneumonia associada a ventilação mecânica: revisão integrativa: Preventive Care For Pneumonia Mechanical Ventilation Associated: Integrative Review. **Revista Enfermagem Atual In Derme**, v. 91, n. 29, 2020. <https://doi.org/10.31011/read-2020-v.91-n.29-art.542>

CAIRNS, S. et al. Molecular analysis of microbial communities in endotracheal tube biofilms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. e14759, 2011. Disponível em:

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014759>.

CARVALHO, C. R. R. DE; TOUFEN, C., Jr; FRANCA, S. A. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 33 Suppl 2S, p. S54-70, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1806-37132007000800002>

CHARLES, M. P. et al. Ventilator-associated pneumonia. **The Australasian medical journal**, v. 7, n. 8, p. 334–344, 2014. <http://dx.doi.org/10.4066/AMJ.2014.2105>

COELHO, L. S. et al. Como Diagnosticar e Tratar Pneumonias. **Revista Brasileira de Medicina**. Dezembro de 2009.

CORRÊA, R. DE A. et al. 2018 recommendations for the management of community acquired pneumonia. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 44, n. 5, p. 405–423, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1806-37562018000000130>

DUNG, T. T. N. et al. Development and validation of multiplex real-time PCR for simultaneous detection of six bacterial pathogens causing lower respiratory tract infections and antimicrobial resistance genes. **BMC infectious diseases**, v. 24, n. 1, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09028-2>

ELIAS, C. DE MV et al. Evidências científicas sobre prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica: revisão integrativa. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, v. 9, n. 7, pág. e954975104, 2020. Doi 10.33448/rsd-v9i7.5104

EL-SOLH, A. A. et al. Colonization of dental plaques. **Chest**, v. 126, n. 5, p. 1575–1582, 2004. [https://doi.org/10.1016/S0012-3692\(15\)31374-X](https://doi.org/10.1016/S0012-3692(15)31374-X)

FONTELA, P. C. et al. Variable mechanical ventilation. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 29, n. 1, p. 77–86, 2017. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20170012>

FOURRIER, F. et al. Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. **Critical care medicine**, v. 26, n. 2, p. 301–308, 1998. 10.1097/00003246-199802000-00032

FRANCO, JB; SILVA, MCS; OLIVEIRA, LP; SANTOS, RP Higiene bucal para pacientes intubados sob ventilação mecânica assistida na unidade de terapia intensiva: proposta de protocolo. **Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo** , 2014;59(2):126-131.

GARGIONI FILHO, A. C. et al. Perfil microbiológico do biofilme no tubo orotraqueal dos pacientes extubados: Revisão da literatura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e45010714661, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i7.14661>

GOMES, M. Community-acquired pneumonia: challenges of the situation in Brazil. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia**, v. 44, n. 4, p. 254–256, 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/s1806-37562018000040002>.

HESPANHOL, V.; BÁRBARA, C. Pneumonia mortality, comorbidities matter? **Pulmonology**, v. 26, n. 3, p. 123–129, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2019.10.003>

JOHNSON, J. L.; HIRSCH, C. S. Aspiration pneumonia. Recognizing and managing a potentially growing disorder. **Postgraduate medicine**, v. 113, n. 3, p. 99–102, 105–6, 111–2, 2003. <https://doi.org/10.3810/pgm.2003.03.1390>

KALIL, A. C. et al. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America and the American thoracic society. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 63, n. 5, p. e61–e111, 2016.

LANKS, C. W.; MUSANI, A. I.; HSIA, D. W. Community-acquired pneumonia and hospital-acquired pneumonia. **The Medical clinics of North America**, v. 103, n. 3, p. 487–501, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2018.12.008>

LIMA, R. DE M. et al. Estudo dos casos de pneumonia por pneumonia no município de Parnaíba-PÍ: Study of the cases of pneumonia in the city of Parnaíba-PÍ. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 12, p. 78404–78417, 2022.

LUCA, Fernando Augusto de. **PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO (POP) DE HIGIENE BUCAL NA PREVENÇÃO DE PNEUMONIA ASSOCIADA À VENTILAÇÃO MECÂNICA – PAVM, EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA: ESTUDO NÃO RANDOMIZADO, ABERTO, COM AVALIADOR CEGO**. 2019. 28 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Pesquisa Clínica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019.

MANDELL, L A. Community-acquired pneumonia: an overview. **Postgraduate Medicine**, [S.L.], v. 127, n. 6, p. 607-615, 29 jul. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/00325481.2015.1074030>.

MCEACHERN, R.; CAMPBELL, G. D., Jr. Hospital-acquired pneumonia: Epidemiology, etiology, and treatment. **Infectious disease clinics of North America**, v. 12, n. 3, p. 761–779, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70209-9](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70209-9)

MELO, M. M. et al. Ventilator-Associated Pneumonia: the Knowledge of Health Professionals Towards Prevention and Educational Measures / Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica: Conhecimento dos Profissionais de Saúde Acerca da Prevenção e Medidas Educativas. **Revista de Pesquisa Cuidado é Fundamental Online**, v. 11, n. 2, p. 377–382, 2019. <https://doi.org/10.9789/2175-5361.2019.v11i2.377-382>

MORAIS, T. M. N. DE et al. A importância da atuação odontológica em pacientes internados em unidade de terapia intensiva. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 18, n. 4, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0103507X2006000400016>

NEEDLEMAN, I. G. et al. Randomized controlled trial of toothbrushing to reduce ventilator-associated pneumonia pathogens and dental plaque in a critical care unit: Toothbrushing and VAP. **Journal of clinical periodontology**, v. 38, n. 3, p. 246–252, 2011b. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01688.x>

OLIVEIRA, J.; ZAGALO, C.; CAVACO-SILVA, P. Prevention of ventilator-associated pneumonia. **Revista portuguesa de pneumologia**, v. 20, n. 3, p. 152–161, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.rppneu.2014.01.002>

OLIVEIRA, L. C. B. S. DE et al. A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 19, n. 4, p. 428–433, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X200700040000>

ÖZÇAKA, Ö. et al. Chlorhexidine decreases the risk of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients: a randomized clinical trial: CHX decreases VAP in ICU. **Journal of periodontal research**, v. 47, n. 5, p. 584–592, 2012. Doi: [10.1111/j.1600-0765.2012.01470.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2012.01470.x)

QUADROS, C. T. P. DE et al. Importância dos cuidados de higiene oral realizados em pacientes intubados no centro de terapia intensiva. **Saúde Coletiva (Barueri)**, v. 9, n. 51, p. 1933–1938, 2020. <https://doi.org/10.36489/saudecoletiva.2019v9i51p1933-1938>

RABELLO, F.; ARAÚJO, V. E.; MAGALHÃES, S. Effectiveness of oral chlorhexidine for the prevention of nosocomial pneumonia and ventilator-associated pneumonia in intensive care units: Overview of systematic reviews. **International journal of dental hygiene**, v. 16, n. 4, p. 441–449, 2018. <https://doi.org/10.1111/idh.12336>

RAGHAVENDRAN, K.; MYLOTTE, J. M.; SCANNAPIECO, F. A. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. **Periodontology 2000**, v. 44, n. 1, p. 164–177, 2007b. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00206.x>

RODRIGUES, A. N. et al. Impactos e fatores determinantes no bundle de pneumonia associada à ventilação mecânica. **Revista brasileira de enfermagem**, v. 69, n. 6, p. 1108–1114, 2016. DOI: [10.1590/0034-7167-2016-0253](https://doi.org/10.1590/0034-7167-2016-0253)

SAENSOM, D. et al. Oral health and ventilator-associated pneumonia among critically ill patients: a prospective study. **Oral diseases**, v. 22, n. 7, p. 709–714, 2016b. DOI: 10.1111/odi.12535

SCANNAPIECO, F. A. Pneumonia in nonambulatory patients. The role of oral bacteria and oral hygiene. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 137 Suppl, p. 21S-25S, 2006. DOI: 10.14219/jada.archive.2006.0400

SILVA, G. E. M. et al. Odontologia hospitalar no Brasil: onde estamos? Uma análise do cenário dos últimos anos. **Revista da Faculdade de Odontologia, Porto Alegre**, v. 61, n. 1, p. 94–100, 2020. <https://doi.org/10.22456/2177-0018.99716>

SOTGIU, G. et al. QuantiFERON TB Gold Plus for the diagnosis of tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. **The Journal of infection**, v. 79, n. 5, p. 444–453, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2019.08.018>

SOUZA, C. R. DE; SANTANA, V. T. S. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 24, n. 4, p. 401–406, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-507X2012000400018>

TUON, F. F. et al. Prospective, randomised, controlled study evaluating early modification of oral microbiota following admission to the intensive care unit and oral hygiene with chlorhexidine. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 8, p. 159–163, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2016.12.007>

VAN ZELLER, M. et al. Clinical challenges of persistent pulmonary air-leaks--case report. **Revista portuguesa de pneumologia**, v. 20, n. 3, p. 162–166, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rppneu.2013.07.004>

VIDAL, CFL Impacto da higiene oral com clorexidina com e sem escovação dentária na prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica: estudo randomizado. 2014. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014. Disponível em: <<https://repositório.ufpe.br/manipular/123456789/12053>>.

VILELA, M. C. N. et al. Oral care and nosocomial pneumonia: a systematic review. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 13, n. 2, p. 290–296, 2015. <https://doi.org/10.1590/S1679-45082015RW2980>

ANEXO A – INSTRUÇÕES PARA AUTORES REVISTA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E BIOLÓGICAS

2 APRESENTAÇÃO DOS TRABALHOS

Os originais destinados à **Revista de Ciências Médicas e Biológicas** deverão ser apresentados de acordo com as normas a seguir, baseadas, principalmente, na Norma de Vancouver :

2.1 Os textos poderão ser redigidos em português, inglês, francês e/ou espanhol e digitados na fonte Times New Roman, corpo 12, com espaço de 1,5 cm, margem de 3 cm de cada lado. Se o texto for em outro idioma (inglês, espanhol ou francês), após o comunicado de preliminar indicação para publicação, o mesmo deverá ser reavaliado/reescrito por um tradutor credenciado e indicado pela Revista para a autorização da versão definitiva.

2.2 As ilustrações (gráficos, desenhos, quadros, etc.) deverão ser limitadas ao mínimo indispensável, construídas preferencialmente em programa apropriado, como Excell, Harvard, Graphics ou outro, fornecidas em formato digital

As fotografias deverão ser fornecidas em papel ou em slides ou cromo. A indicação do tipo de ilustração (Figura, Quadro, etc.) deve estar localizada na parte superior da mesma, seguida da numeração correspondente em algarismos arábicos (Figura 1-, Quadro 5-) e do respectivo título precedido de travessão; a legenda explicativa deve ser clara e concisa, em corpo 10. No caso de ilustrações extraídas de outros trabalhos, será necessário indicar a fonte.

2.3 As tabelas estatísticas também serão numeradas consecutivamente em algarismos arábicos, mas apresentarão a respectiva identificação — p.ex., Tabela 1 - Título; Tabela 2 - Título, etc. — na parte superior, observando-se para a sua montagem as **Normas de apresentação tabular** do IBGE (1993).

2.4 Deverão ser indicados, no texto, os locais aproximados em que as ilustrações e as tabelas serão intercaladas.

2.5 As notas de rodapé serão indicadas por asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

2.6 Recomenda-se anotar no texto: os nomes compostos e dos elementos, em vez de suas fórmulas ou símbolos; os períodos de tempo por extenso, em vez de em números; binômios da nomenclatura zoológica e botânica por extenso e em itálico, em vez de abreviaturas; os símbolos matemáticos e físicos conforme as regras internacionalmente aceitas; e os símbolos métricos de acordo com a legislação brasileira vigente.

2.7 No preparo do texto original, deverá ser observada, na medida do possível, a estrutura indicada em **2.7.1 a 2.7.2, na mesma ordem** em que seus elementos apresentam-se a seguir.

2.7.1 Elementos pré-textuais

a) Cabeçalho, em que devem figurar:

- o título do artigo e o subtítulo (quando houver) concisos, contendo somente as informações necessárias para a sua identificação. Quando os artigos forem em português, deve-se colocar o título e o subtítulo em português e inglês; quando os artigos forem em inglês, francês ou espanhol, na língua em que estiverem redigidos e em português;
- o(s) nome(s) do(s) autor(es) acompanhado(s) da sua titulação mais importante e vínculo empregatício (se houver), a qual será a ser inserida em nota de rodapé juntamente com o endereço profissional completo, inclusive telefone e *e-mail* do autor ou co-autoria, principal do trabalho.

b) Resumo (português) e Abstract (Inglês)– Apresentação concisa e estruturada dos pontos relevantes do texto, de modo a permitir avaliar o interesse do artigo, prescindindo-se de sua leitura na íntegra. Para a sua redação e estilo, deve-se observar o que consta na NBR - **6028/2021**, e não exceder as 250 palavras recomendadas. Se o texto for em outra língua (espanhol ou francês) observa-se o mesmo procedimento. Sendo o artigo, preliminarmente, indicado para publicação, o resumo em idioma estrangeiro deverá ser reescrito por um tradutor credenciado e indicado pela Revista para fazer a versão definitiva do mesmo.

c) Palavras-chave e Keywords – palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do texto (no máximo 5), separadas por ponto e vírgula e finalizada por ponto, que constem no Descritores em Ciências de Saúde (DeCS), no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br/> ou MeSH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh>).

2.7.2 Texto

a) Introdução – Deve apresentar com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos na mesma linha ou área. Extensas revisões de literatura devem ser evitadas e, quando possível, substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, em que certos aspectos e revisões já tenham sido apresentados. Os trabalhos e resumos originários de dissertações ou teses devem sofrer modificações, de modo a se apresentarem adequadamente como um texto em nova formatação e atendendo às demais exigências da Revista em relação a ilustrações, fotos, tabelas, etc.

b) Materiais e métodos – A descrição dos métodos usados deve ser suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho, não sendo extensa. Técnicas já publicadas, a menos que tenham sido modificadas, devem ser apenas citadas (obrigatoriamente).

c) Resultados – Devem ser apresentados com o mínimo possível de discussão ou interpretação pessoal, acompanhados de tabelas e/ou material ilustrativo adequado, quando necessário. Dados estatísticos devem ser submetidos a análises apropriadas.

d) Discussão – Deve se restringir ao significado dos dados obtidos, resultados alcançados, relação com o conhecimento já existente, evitando-se hipóteses não fundamentadas nos resultados.

e) Conclusão – Devem estar baseadas no próprio texto.

2.7.3 Elementos pós-textuais

a) Referências – Devem ser elaboradas de acordo com o Padrão Vancouver (International Committee of Medical Journal Editors -ICMJE). As referências devem ser organizadas **em ordem numérico crescente** (algarismos arábicos), utilizando duas maneiras para as citações no texto o **sistema numérico sobrescrito**^{3,4,7-10} ou **alfanumérico um autor** Gatewood³¹ (2012), **dois autores** Cotti, Santos¹² (2016), três autores Azer, Safi, Almeida²³ (2011) e mais que quatro autores Silva et al.¹⁵ (2013). As abreviaturas dos títulos dos periódicos citados devem estar de acordo com as bases e/ou Portal de revista BVS, Medline ou LILACS. A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores. Serão incluídas na lista final todas as referências de textos que contribuíram efetivamente para a realização do trabalho, as quais, no entanto, de 20, exceto artigos de revisão já os originais não devem ultrapassar o número máximo de 35. Quanto aos trabalhos citados no texto, todos serão obrigatoriamente incluídos na lista de Referências. Informações verbais, trabalhos em andamento ou não publicados não devem ser incluídos na lista de Referências; quando suas citações forem imprescindíveis, os elementos disponíveis serão mencionados no rodapé da página em que ocorra a citação.

ANEXO B- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE DE UBERABA -
UNIUBE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO ENTRE CONDIÇÃO E COLONIZAÇÃO ORAL E DESENVOLVIMENTO DE PNEUMONIA ASSOCIADA A VENTILAÇÃO MECÂNICA

Pesquisador: Ruchele Dias Nogueira

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 76451423.0.0000.5145

Instituição Proponente: SOCIEDADE EDUCACIONAL UBERABENSE

Patrocinador Principal: Sociedade Educacional Uberabense

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.589.589

Apresentação do Projeto:

A presente proposta tem como título "ASSOCIAÇÃO ENTRE CONDIÇÃO E COLONIZAÇÃO ORAL E DESENVOLVIMENTO DE PNEUMONIA ASSOCIADA A VENTILAÇÃO MECÂNICA", e está sob a responsabilidade da Dra. Ruchele Dias Nogueira. Trata-se de um estudo analítico observacional, que trabalha com a hipótese de que há uma correlação positiva entre a detecção de espécies microbianas na cavidade oral e aspirado traqueal de pacientes com Pneumonia Aspirativa por Ventilação Mecânica (PAVM). Para isso, estima-se a participação de 60 voluntários atendidos pela Unidade de Terapia Intensiva do Hospital Regional de Uberaba, com indicação de intubação endotraqueal. Os dados serão tabulados e tratados estatisticamente, sendo trabalhados dentro de um nível de confiança de 95%.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário

Retira-se do texto:

"Investigar a correlação de detecção de bactérias no biofilme oral, saliva e aspirado traqueal de pacientes com indicação de entubação e associar com o desenvolvimento de PAVM".

Endereço: Av. Nene Sabino, 1801

Bairro: Universitário

CEP: 38.055-500

UF: MG

Município: UBERABA

Telefone: (34)3319-8816

Fax: (34)3314-8910

E-mail: cep@uniube.br

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do participante da pesquisa: _____

Nome do responsável _____

Título do projeto: **ASSOCIAÇÃO ENTRE CONDIÇÃO E COLONIZAÇÃO ORAL E DESENVOLVIMENTO DE PNEUMONIA ASSOCIADA A VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Instituição onde será realizado: *Universidade de Uberaba Avenida Nenê Sabino, 1801 - (34)33198913 e Hospital Regional José de Alencar*

Responsável: *Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, CRO/MG 51079 - ruchele.nogueira@uniube.br*

CEP-UNIUBE: Av. Nenê Sabino, 1801- 38055-500-Uberaba/MG, tel: 34-3319-8816 e-mail: cep@uniube.br

Você está sendo convidado para participar do projeto "ASSOCIAÇÃO ENTRE CONDIÇÃO E COLONIZAÇÃO ORAL E DESENVOLVIMENTO DE PNEUMONIA ASSOCIADA A VENTILAÇÃO MECÂNICA", de responsabilidade do(a) Prof(a). Dr(a). Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins, cirurgiã dentista registrada no Conselho Regional de Odontologia de Minas Gerais com o nº 51079. O CEP/UNIUBE é um grupo de profissionais da Universidade de Uberaba criado para defender as pessoas que participam da pesquisa para que não sejam lesadas, tenham riscos e que suas informações e identificações não sejam espalhadas.

Este projeto tem como objetivo detectar possíveis associações entre micro-organismos encontrados em amostras traqueal e oral, dados de condição oral e desenvolvimento de pneumonia após a intubação. Este projeto se justifica pela necessidade de se investigar o desenvolvimento de pneumonias em pacientes submetidos a intubação traqueal, por aumentar os riscos de morte do paciente. Os micro-organismos envolvidos na infecção são muito variados, mas há fortes evidências, de que, as bactérias da boca e as condições orais do paciente, podem estar associadas ao desenvolvimento destas pneumonias.

Se aceitar participar desse projeto, você autoriza que, antes do processo de intubação e após 4 dias seguintes e depois uma vez na semana, cirurgiões dentistas, envolvidos no projeto, realizem coletas de sua saliva e da massa de bactérias que se acumulam ao redor dos seus dentes. Em seguida, realizem um exame clínico e limpeza da sua boca. As amostras traqueais serão coletadas pela equipe especializada na unidade.

Estas amostras serão encaminhadas para análises laboratoriais para detecção de bactérias. Os resultados destas análises ficarão a sua disposição, para seu conhecimento. Após as coletas iniciais você será entrevistado e um questionário sobre sua saúde geral e odontológica. Após esta entrevista, o pesquisador lhe dará instruções sobre higiene e prevenção de doenças orais, como a cárie e doença periodontal. Estes dados poderão dar informações aos profissionais e pacientes da importância da boca e sua condição na prevenção e desenvolvimento das pneumonias em intubados.

Os desconfortos serão mínimos, pois as coletas não causarão dor e não serão invasivas. Os materiais serão coletados por pessoas experientes e que tomarão todo o cuidado para que nenhum risco ocorra. Se ocorrerem, serão passageiras. Os seus dados serão mantidos em sigilo e utilizados apenas com fins científicos, tais como apresentações em congressos e publicação de artigos científicos. Existe o risco de perda de confidencialidade dos dados, para que isto não ocorra seu nome ou qualquer identificação sua (voz, foto, etc) jamais aparecerá. Os seus dados serão confidenciais e repassados para terceiros, somente após a devida anonimização por codificação. Os bancos de dados terão senhas e somente os responsáveis pela pesquisa terão acesso às informações do questionário assegurando-se o compromisso profissional com o sigilo absoluto das informações no TCLE. Pela sua participação no estudo, você não receberá nenhum pagamento e também não terá nenhum custo. Você pode parar de participar a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo para você ou para seu tratamento/atendimento. Sinta-se à vontade para solicitar, a qualquer momento, os esclarecimentos que você julgar necessários. Caso decida-se por não participar, ou por não ser submetido a algum procedimento que lhe for solicitado, nenhuma penalidade será imposta a você, nem seu tratamento ou atendimento será alterado ou prejudicado.

Caso participe dessa pesquisa, você poderá ter acesso aos resultados encontrados, quando ela for concluída. Para isso deixe um e-mail para envio: _____

Você receberá uma via desse termo, assinada pelo responsável pela pesquisa, onde consta a identificação e os telefones da equipe de pesquisadores, caso você queira entrar em contato com eles.

Nome do paciente/responsável e assinatura

Prof. Dra Ruchele Dias Nogueira Geraldo Martins – CRO/MG 51079

ANEXO D – FORMULÁRIO DA PESQUISA DADOS CLÍNICOS E PESSOAIS

IDENTIFICAÇÃO E HISTÓRIA SOCIAL

Nome:			
Data de Nascimento ____/____/____	Sexo: <input type="checkbox"/> Masculino <input type="checkbox"/> Feminino	Etnia (auto-declarada ou declarada pelos pais/responsável) <input type="checkbox"/> Branco <input type="checkbox"/> Negro <input type="checkbox"/> Amarelo <input type="checkbox"/> Pardo <input type="checkbox"/> Índio	
Cidade onde nasceu:	Nacionalidade:	Ensino: <input type="checkbox"/> infantil <input type="checkbox"/> fundamental:____ <input type="checkbox"/> médio:____ <input type="checkbox"/> não frequenta escola Tipo de escola: <input type="checkbox"/> pública <input type="checkbox"/> particular	
Nome da mãe Idade: _____ Profissão: _____			RG ou CPF
Nome do pai Idade: _____ Profissão: _____			RG ou CPF
Nome do responsável Idade: _____ Profissão: _____			RG ou CPF
Grau de escolaridade da mãe <input type="checkbox"/> analfabeto <input type="checkbox"/> fundamental incompleto <input type="checkbox"/> fundamental completo <input type="checkbox"/> médio incompleto <input type="checkbox"/> médio completo <input type="checkbox"/> superior incompleto <input type="checkbox"/> superior completo <input type="checkbox"/> pós graduação		Grau de escolaridade do pai <input type="checkbox"/> analfabeto <input type="checkbox"/> fundamental incompleto <input type="checkbox"/> fundamental completo <input type="checkbox"/> médio incompleto <input type="checkbox"/> médio completo <input type="checkbox"/> superior incompleto <input type="checkbox"/> superior completo <input type="checkbox"/> pós graduação	
Grau de escolaridade do responsável <input type="checkbox"/> analfabeto <input type="checkbox"/> fundamental incompleto <input type="checkbox"/> fundamental completo <input type="checkbox"/> médio incompleto <input type="checkbox"/> médio completo <input type="checkbox"/> superior incompleto <input type="checkbox"/> superior completo <input type="checkbox"/> pós graduação		Grau de parentesco do responsável	
Endereço			Complemento
Bairro		Cidade	CEP
Quantos cômodos tem sua casa?		Quantas pessoas moram com você?	Renda familiar:
Telefone (residencial)	Telefone (comercial)	Celular	Telefone de contato
Email:			

HISTÓRIA MÉDICA

ANTECEDENTES FAMILIARES

Há relato na família de Diabetes, Epilepsia, Cardiopatia, Hipertensão, Câncer; Hepatite, Problemas comportamentais ou neurológicos, AIDS, Sífilis: (anotar quais e grau de parentesco)

Doenças de infância:

- () sarampo () caxumba () catapora () difteria () coqueluche () diabetes
 () bronquite () anemia () asma () visão () audição () coração () pulmões
 () pele () estômago () intestino () fígado () rins () bexiga
 () tireóide () hormonal () hemorragia () rinite alérgica
 () outras. Especifique os problemas: _____

Já esteve hospitalizado? () não () sim. Motivo: _____

Tem alergia? () não () sim. A quê? _____

A vacinação está em dia? () não () sim Quais?: _____

Já teve/tem hoje algum dos problemas abaixo:

- Hemorragias () Convulsão () Desmaios () Problema Cardíaco () Diabetes ()
 Febre Reumática () Aids () Anemia () Transtornos Alimentares () Refluxo ()
 Deficit de atenção () Hperatividade () Problema comportamental () Doença auto imune ()

HISTÓRIA ODONTOLÓGICA E HÁBITOS

Quando procurou um dentista pela ultima vez? _____

Realizou o tratamento? () Sim () Não Qual o motivo? _____

Terminou o Tratamento? () Sim () Não Qual o motivo? _____

Dieta: Avaliação do diário alimentar (Cirurgião Dentista) () Dieta cariogênica () Dieta não cariogênica

Com que frequência escova os dentes? _____ Em qual horario? _____

Usa fio dental? () Não () Sim. Quando? _____

Faz bochechos em casa? () Não () Sim Qual produto? _____

Já recebeu orientação de higiene bucal? () Sim () Não () Não sei

EXAME CLINICO

1 EXAME FÍSICO GERAL Altura: _____ m Peso: _____ kg

2 EXAME FÍSICO EXTRA-BUCAL

Gânglios linfáticos () normal () alterado, Obs: _____

ATM () normal () alterado, Obs: _____

Musculatura Facial () normal () alterado, Obs: _____

Simetria Facial () não () sim, Obs: _____

Linha media facial () normal () alterado, Obs: _____

Perfil facial () reto () convexo () côncavo

Selamento labial () adequado () inadequado

Respiração () nasal () bucal () mista

3 EXAME FÍSICO INTRA-BUCAL

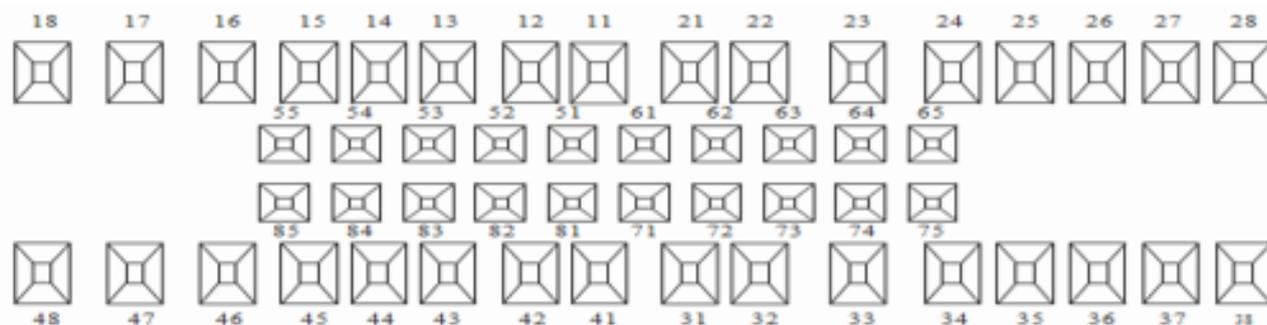
Alteração de tec. mole () não () sim, Obs: _____

4 EXAME CLÍNICO

Forma facial () Mesofacial () Braquifacial () Dolicofacial

Perfil Facial () Reto () Côncavo () Convexo

ODONTOGRAMA



Estado atual dos dentes

55	_____	65	_____	75	_____	85	_____
54	_____	64	_____	74	_____	84	_____
53	_____	63	_____	73	_____	83	_____
52	_____	62	_____	72	_____	82	_____
51	_____	61	_____	71	_____	81	_____
18	_____	28	_____	38	_____	48	_____
17	_____	27	_____	37	_____	47	_____
16	_____	26	_____	36	_____	46	_____
15	_____	25	_____	35	_____	45	_____
14	_____	24	_____	34	_____	44	_____
13	_____	23	_____	33	_____	43	_____
12	_____	22	_____	32	_____	42	_____
11	_____	21	_____	31	_____	41	_____

