

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA

OLEG GAVRILKO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE SUSCETIBILIDADE
ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS DA MUCOSA BUCAL E BIOFILME DENTAL
APÓS O USO DE SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA EM PACIENTES SOB
VENTILAÇÃO MECÂNICA**

CURITIBA

2016

OLEG GAVRILKO

**AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE SUSCETIBILIDADE
ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS DA MUCOSA BUCAL E BIOFILME DENTAL
APÓS O USO DE SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA EM PACIENTES SOB
VENTILAÇÃO MECÂNICA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, requisito à obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. Felipe Francisco Tuon
Co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo Rosa

CURITIBA

2016



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
= MESTRADO e DOUTORADO =

PARECER

Aos vinte e cinco dias do mês de agosto do ano de dois mil e dezesseis, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. Keite da Silva Nogueira (Depto. de Patologia Básica - UFPR), Dra. Marilene da Cruz Magalhães Buffon (Depto. de Saúde Comunitária - UFPR), Dra. Libera Maria Dalla Costa Maria (Depto. UFPR), Dr. Hélio Afonso G. Teive (Depto. Clínica Médica - UFPR) e Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon (Depto. Saúde Comunitária - UFPR). exarou o presente parecer sobre a tese de doutorado elaborada por OLEG GRAVILKO, aluno concluinte do Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado e Doutorado da Universidade Federal do Paraná, intitulada: "AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS DA MUCOSA BUCAL E BIOFILME DENTAL APÓS O USO DE SOLUÇÃO DE CLOREXIDINA EM PACIENTES SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA". A Banca examinadora considerou que o aluno, apresentou trabalho adequado para tese, e o defendeu com segurança e propriedade nas argüições que lhe foram feitas, de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Doutora em Medicina Interna**. A banca considerou o trabalho de grande relevância à Saúde Pública, e recomendam a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial depois de incorporadas às sugestões apresentadas no decurso das argüições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Professora Dra. Keite da Silva Nogueira

Professora Dra. Marilene da Cruz Magalhães Buffon

Professora Dra. Libera Maria Dalla Costa Maria

Professor Dr. Hélio Afonso G. Teive

Professor Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

Only those who will risk going to far
can possibly find out
how far one can go.

T.S Eliot.

Dedico este trabalho a Deus
a minha Família, amigos e
ao meu Orientadores.

Sem eles nada disso seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo força que Ele me deu nos momentos mais difíceis e pela oportunidade de poder finalizar esse trabalho

Agradeço a minha esposa Olga e meus quatro filhos pelo carinho e encorajamento que me darem e pela compreensão nos momentos em que precisei estar ausente.

Sem o apoio da minha família seria muito difícil vencer esse desafio.

Ao Coordenadores do Programa de Pos Graduação em Medicina Interna e Ciências da Saude Mestrado/Doutorado do UFPR Prof.Dr.Helio Afonso Ghizoni Teive, Prof.Dra Iara Jose Taborda de Messias-Reason pelos ensinamentos.

Agradeço ao meu Orientador Prof. Dr. Felipe Francisco Tuon, Co-Orientador Prof.Dr.Edvaldo Rosa,pela sabedoria com que me guiou e pela dedicação.

Ao UTI e Laboratório do Hospital Universitario Evangélico de Curitiba pela cooperação, em especial a Dr.Juliette e funcionários.

A Secretaria do Departamento do Medicina Intensiva Srs. Lucia e Valeria pela cooperação.

Os Colegas de Professora Dra Analise e Sr.Stanislav pelo apoio prestado na Clinica.

Enfim,a todos os que de alguma maneira contribuíram para a realização desta pesquisa e trabalho.

RESUMO

Introdução: A mudança na microbiota do biofilme dental após o uso de solução de clorexidina (CHX) oral em pacientes sob ventilação mecânica não foi descrita. **Objetivo:** O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de bactérias patogênicas associadas a PAVM (pneumonia associada a ventilação mecânica) em mucosa bucal (OM) e da placa dentária (DP) em pacientes em uso de solução de CHX. **Métodos:** Um estudo randomizado, controlado, estudo prospectivo, duplo-cego. Pacientes submetidos à ventilação mecânica foram randomizados para a higiene bucal com CHX ou placebo. Amostras clínicas foram coletadas de OM e DP após a admissão e, em seguida, nos dias 3, 5, 7 e 10. A determinação da concentração inibitória mínima de clorexidina e concentração bactericida mínima foram realizadas. **Resultados:** 16 pacientes foram incluídos. No dia 5, todos os pacientes tiveram culturas positivas para OM e DP. No momento da admissão, 6 pacientes tiveram bactérias multirresistentes, incluindo uma *Klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistente. O grupo CHX teve uma menor percentagem de MRSA que no grupo placebo em OM [RR = 0,51 (0,27-0,98), p = 0,011]. Houve alta concordância de culturas entre OM e DP (índice de kappa = 0,825). PAVM ocorreu em 6 pacientes e as espécies identificadas na aspiração traqueal de pacientes PAVM foram semelhantes aos encontrados no OM em 4 casos. Todas as cepas apresentaram baixa MIC e MBC para CHX (<0,039 mg / mL). **Conclusão:** DP é rapidamente colonizado por bactérias multirresistentes e que a solução de CHX a 2% reduziu a colonização por *Staphylococcus aureus*.

Palavras chave: pneumonia associada à ventilação mecânica; clorexidina; microbiota bucal; unidade de terapia intensiva.

ABSTRACT

Background: The change in dental plaque microbiota following chlorhexidine (CHX) use in patients under mechanical ventilation has not been described. Objective: The aim of this study is to evaluate the presence of pathogenic bacteria associated with VAP (ventilator associated pneumonia) in oral mucosa(OM) and dental plaque(DP) in patients using chlorhexidine. Methods: A prospective, randomized, controlled, double-blind study. Patients submitted to mechanical ventilation were randomized for oral hygiene with CHX or placebo. Microbiology samples were collected from OM and DP after admission and then on days 3, 5, 7 and 10. Determination of chlorhexidine minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration were performed. Results: 16 patients were included. In day 5, all patients had positive cultures for OM and DP. Upon admission, 6 patients had multidrug-resistant bacteria, including a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. The CHX group had a lower percentage of MRSA than placebo group in OM [RR=0.51(0.27-0.98), p=0.011]. There was a high concordance of cultures between OM and DP (kappa index=0.825). VAP occurred in 6 patients and the species identified in tracheal aspiration of VAP patients were similar to those found in the OM in 4 cases. All strains showed low MIC and MBC for CHX (<0.039 mg/mL). Conclusion: DP is rapidly colonized with multidrug-resistant bacteria and that 2% chlorhexidine reduced colonization by *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Gráfico 1: Comparação entre o número de culturas identificadas ao longo do tempo em pacientes que fizeram o uso de clorexidina e de placebo..... 22
- Tabela 1: Características clínicas e resultados de culturas de swab oral e raspado dentário de pacientes admitidos na UTI em diferentes dias de ventilação mecânica..... 22
- Tabela 2: Comparação entre pacientes submetidos à higienização oral com clorexidina ou placebo em relação ao perfil microbiológico obtido por swab de cavidade oral ou raspado dentário..... 23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMK	-amicacina
CAND	- <i>Candida albicans</i>
CAZ	-ceftazidimia
CBM	-concentração bactericida mínima
CDC	-Centro de controle e prevenção de doenças
CESP	- <i>Citrobacter, Enterobacter, Serratia, Proteus</i>
CFZ	-cefazolina
CHX	-Clorexidina
CIM	-Concentração inibitória mínima
CIP	-ciprofloxacino
CLSI	-Clinical and Laboratory Standard Institute
COL	-colistina
CRAB	-Carbapenem resistente <i>Acinetobacter baumannii</i>
CRPA	-Carbapenem resistente <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CSAB	-Carbapenem sensível <i>Acinetobacter baumannii</i>
CSPA	-Carbapenem sensível <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
DP	-Placa dental
ESBL	-Beta-Lactamase de Espectro Estendido
GNB/BGN	-Gram-negativo bacilo
GPC/CGP	-Gram-positivo coco
HIV	-Vírus da Imunodeficiência Humana
IC	-Intervalo de confiança
KLEB	- <i>Klebsiella</i> spp.
KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
PROT	- <i>Proteus</i> spp.
MDR	-Multidrug resistant bacteria;
MEM	-meropenem
MRSA	-Meticilina resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	-Meticilina sensível <i>Staphylococcus aureus</i>
OHB	-Orientação de higiene bucal
OM	-Mucosa oral

PAVM	-Pneumonia associada à ventilação mecânica
PIP	-piperacilina/tazobactam
RR	-Risco relativo
STENO	- <i>Stenotrophomonas</i> spp.
TCLE	-Termo de consentimento livre e esclarecido
UTI	-Unidade de terapia intensiva
VAN	-vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Geral	3
2.2	Específico	3
3	REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1	Pneumonia associada à ventilação mecânica	5
3.2	Microbiota da cavidade bucal	6
3.3	Mudança de microbiota da cavidade bucal e do trato respiratório	7
3.4	Prevenção de PAVM	8
3.5	Clorexidina	9
4	MATERIAL E MÉTODOS	12
4.1	Tipo de estudo	12
4.2	Critérios de Inclusão	12
4.3	Critérios de Exclusão	12
4.4	Intervenção	13
4.5	Dados clínicos	13
4.6	Amostras biológicas	13
4.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de clorexidina e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	14
4.8	Análise estatística	15
5	RESULTADOS	17
5.1	Dados clínicos	17
5.2	Culturas	19
5.3	Comparação entre placebo e solução de clorexidina a 2%	20
5.4	CIM e CBM	21
6	DISCUSSÃO	22
7	CONCLUSÃO	27
8	REFERÊNCIAS	28
9	ANEXOS	36
9.1	ANEXO A	36

9.2 ANEXO B	40
9.3 ANEXO C	43

1 INTRODUÇÃO

Pacientes submetidos à ventilação mecânica nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) apresentam alto risco para desenvolvimento de pneumonia hospitalar. Nos pacientes que desenvolvem pneumonia durante a ventilação mecânica após 48 horas do seu início é chamada de pneumonia associada a ventilação mecânica (PAVM). A PAVM aumenta a mortalidade e o tempo de permanência hospitalar (LORENTE, 2012).

Sabe-se, hoje, que o biofilme dental é fator etiológico primordial para o início do processo inflamatório e de afecções da cavidade bucal – como cáries, gengivites e periodontite – assim como de afecções distantes, como pneumonias e broncopneumonias. Nem sempre a higienização bucal com escovação é uma preocupação em pacientes admitidos em UTI. Desta forma, ocorre o acúmulo e a adesão tanto de bactérias, quanto de detritos alimentares, células epiteliais descamadas, leucócitos, enzimas, sais minerais, polissacarídeos, proteínas, mucina salivar e demais detritos encontrados na cavidade bucal e proveniente de refluxo do trato digestório em pacientes com sondagem gástrica (SILVA, 2011).

Existem evidências suficientes que medidas de higiene bucal podem prevenir esta condição e teoricamente a redução de PAVM (CÁBOV, 2010; ÖZÇAKA, 2012; CONLEY, 2013; SALIM, 2013), embora haja controversa na literatura (BELLISSIMO-RODRIGUES 2009; LORENTE, 2012; SMITH, 2013; YAMAGUCHI, 2013).

Assumindo a correlação da higiene bucal com a prevenção de PAVM, faz-se necessária a manutenção da saúde bucal. Para tanto, é desejável a manutenção do equilíbrio entre nutrição adequada e boa higiene. Essa última pode e deve ser alcançada por meio de procedimentos mecânicos, químicos ou ambos, bem como, quando essa associação for por decisão do cirurgião-dentista. Dentre os procedimentos de higienização, a mecânica, realizada por meio de escovação e da utilização de fios/fitas, é a mais aceita, graças aos inúmeros resultados favoráveis (LÖE e SILNESS, 1963; ANDERSON, 2003; FEJERSKOV e KIDD, 2005; KUMAR e GREEN, 2005). Já a prescrição do controle do biofilme dental com químicos, é considerada de eficiência superior a da mecânica isolada, por alguns, enquanto

outros consideram os resultados semelhantes nos dois processos (LORENTE, 2012; ÖZÇAKA, 2012; COLEY, 2013; SMITH, 2013). Com essa hipótese, as substâncias bactericidas e/ou bacteriostáticas poderiam ser indicadas aos indivíduos que estejam inconscientes. Além do mais, as substâncias antibacterianas podem compensar a eventual falta de motivação da enfermagem para uma boa limpeza do aparelho bucolabiodental, daí ser considerado por muitos como procedimentos meramente coadjuvantes (LORENTE, 2012).

Dentre os produtos químicos mais utilizados, estão a clorexidina *{1,1'-hexametilenebis (5-[p-clorofenil] biguanida)}*. Em odontologia, esta solução é empregada de várias formas, seja para inibir a própria formação do biofilme, seja para limpar campos operatórios; desinfetar canais radiculares; inibir cáries e gengivite, o que é dependente de sua concentração (JOHNSON, 1995). Para isso, usa-se na forma de gel ou de solução para enxague. A maneira de agir dessa biguanida é a de ligação à parede bacteriana, sendo bacteriostática em baixas concentrações e bactericida em concentrações altas. Atua contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, sejam eles aeróbios ou aeróbios facultativos, ou mesmo leveduras (HUSSEY, 1980).

Outra importante propriedade é a sua capacidade de adsorção no esmalte dos dentes e na mucina salivar, com posterior liberação progressiva, exercendo assim um efeito tecidual contínuo e duradouro. As consequências mais comuns são: alterações do paladar, tingimento da superfície bucal, tingimento das restaurações dentárias, geralmente temporárias; dentes com periodontite com cálculos supragengivais ou com restaurações de bordas rugosas podem sofrer descoloração permanente (AUTIO-GOLD, 2008).

A microbiota bucal de pacientes em estado crítico é diferente da de adultos saudáveis e contém organismos que rapidamente podem causar pneumonia. Dentro de 48 horas após a internação, a composição da microbiota orofaríngea de pacientes em estado crítico passa por uma mudança da predominância normal de Gram-positivos e para organismos predominantemente Gram-negativos, que formam uma microbiota mais virulenta que contém patógenos causadores de PAVM (MUNRO e GRAP, 2004). Por outro lado, desconhece-se o efeito que a clorexidina pode exercer sobre essa microbiota (AUTIO-GOLD, 2008). Baseando-se em todas estas questões, fica clara a necessidade de estudos que avaliem o perfil de bactérias

patogênicas na cavidade bucal em pacientes submetidos a ventilação mecânica em uso de solução de clorexidina.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a presença de patógenos respiratórios associados com PAVM na cavidade bucal e no biofilme dental de pacientes submetidos ao uso de solução de clorexidina na higienização bucal.

2.2 Específico

1. Comparar as espécies bacterianas de pacientes submetidos a higienização com clorexidina bucal para prevenção de PAVM com as espécies bacterianas de pacientes de um grupo controle;
2. Identificar o perfil de suscetibilidade antimicrobiana das bactérias encontradas na cavidade bucal e biofilme dental com e sem o uso de solução clorexidina oral, na concentração de 2%;
3. Determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima para clorexidina das bactérias identificadas na cavidade bucal e biofilme dental.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Pneumonia associada à ventilação mecânica

A ventilação mecânica é um recurso utilizado na UTI e tem por objetivos manter as trocas gasosas, corrigindo a hipoxemia e a acidose respiratória associada à hipercapnia, aliviar o trabalho da musculatura respiratória, diminuindo a demanda metabólica; reverter ou evitar a fadiga da musculatura respiratória; diminuir o consumo de oxigênio, dessa forma reduzindo o desconforto respiratório; e permitir a aplicação de terapêuticas específicas no paciente em estado crítico. Apesar do forte benefício ocasionado pela ventilação mecânica, ela também traz consigo algumas consequências, dentre as principais, a PAVM (CARVALHO, 2007).

A pneumonia adquirida no hospital e associada à ventilação mecânica são as infecções nosocomiais que mais acometem pacientes internados em UTI (HUTCHINS, 2009). E está associada a um aumento no período de hospitalização e índices de morbimortalidade, repercutindo de maneira significativa nos custos (FEIJÓ, 2005).

Este tipo de pneumonia é uma infecção grave que atinge o parênquima pulmonar e está associado ao paciente intubado. Apesar dos avanços nas técnicas para a manutenção dos pacientes dependentes de ventilação mecânica e no uso de procedimentos para limpeza e esterilização do equipamento respiratório, a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM) ainda continua ocorrendo em 8% a 67% dos pacientes (SILVESTRINI E CRUZ, 2004).

Considera-se que a pneumonia associada à ventilação mecânica como uma infecção pulmonar que ocorre 48 a 72 horas após a intubação endotraqueal e instituição de ventilação mecânica invasiva. É considerada precoce quando ocorre até o quarto dia de intubação de ventilação e tardia quando ocorre após o quinto dia (CARVALHO, 2006; SILVA, 2011).

Para a ocorrência da pneumonia, é necessário que os patógenos superem os mecanismos de defesa do sistema respiratório: mecânicos (reflexo de tosse, reflexo glótico e sistema mucociliar), humorais (anticorpos e sistema complemento) e celulares (leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e linfócitos). À medida que o ciclo de contaminação, aspiração e patógenos continua, os microrganismos

patogênicos prevalecem sobre as defesas antibactérias do organismo, e o paciente desenvolve pneumonia (SAFDAR, 2005).

A suspeita clínica da presença de PAVM ocorre em função do aparecimento de um novo infiltrado pulmonar, ou à progressão de um infiltrado prévio na radiografia de tórax, associado à presença de sinais clínicos e alterações laboratoriais, como febre, leucocitose, leucopenia e secreção purulenta. A PAVM é uma infecção grave e há alguns fatores de risco que predispõem ao seu desenvolvimento como idade, escore de gravidade quando da entrada do paciente na UTI, uso prévio de antimicrobianos, antiácidos, bloqueadores de receptores de H₂, necessidade de reintubação, posição supina, uso de cânula nasogástrica, presença de traqueostomia e transporte dentro do hospital (SILVA, 2011).

O mecanismo principal para a entrada de patógenos no trato respiratório inferior de pacientes gravemente enfermos é a aspiração de conteúdos da orofaringe ou de secreções que se acumulam acima do balonete do tubo orotraqueal, colonizados por microrganismos bucais, presentes no biofilme dental, que é o acúmulo de bactérias da microbiota bucal sobre a superfície dos dentes (LORENTE, 2012).

3.2 Microbiota da cavidade bucal

A cavidade bucal apresenta uma grande diversidade na sua microbiota. Esses microrganismos utilizam o biofilme dental como reservatório permanente, podendo causar infecções à distância (AMARAL, 2009).

A cavidade bucal é composta por uma complexa microbiota, a qual consiste em mais de 100 milhões de bactérias por mL de saliva, levando a formação de aproximadamente 10 g de bactérias por dia. A complexidade se dá não apenas pela quantidade, mas a forma como cada grupo de microrganismo se adapta aos diferentes ambientes na cavidade bucal, tendo relações diferentes das espécies com a superfícies da língua, superfície do dente e aquelas aderidas ao biofilme, por exemplo (CURTIS, 2011). Essa complexa microbiota levou a criação de um banco de dados sobre a microbiota oral humana (Human Oral Microbiome Database – www.homd.org) a qual lista todas as bactérias identificadas, incluindo um outro

banco de filogenia bacteriana baseada no sequenciamento do porção 16S do rRNA bacteriano (CORE - <http://microbiome.osu.edu>) (GRIFFEN, 2011).

A maioria das bactérias da boca é considerada parte da microbiota normal do paciente, e pode incluir até 350 espécies. Diversos organismos apresentam a tendência de colonizar partes distintas da boca. Por exemplo, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus* e *Bacteroides gingivalis* colonizam principalmente os dentes, enquanto *Streptococcus salivarius* coloniza principalmente o dorso da língua. O *Streptococcus mitis* é encontrado tanto na superfície bucal quanto na superfície dos dentes (GIBBONS, 1989).

A microbiota bucal de pacientes em estado crítico é diferente da de adultos saudáveis e contém organismos que rapidamente podem causar pneumonia. Dentro de 48 horas após a internação, a composição da microbiota orofaríngea de pacientes em estado crítico passa por uma mudança da predominância normal de Gram-positivos e para organismos predominantemente Gram-negativos, que formam uma microbiota mais virulenta que contém patógenos causadores de PAVM (MUNRO e GRAP, 2004).

A saliva também é um elemento importante do ambiente bucal. Ela tem uma série de funções importantes, como a de desprender os microrganismos da boca. Além disso, a saliva contém uma série de substâncias imunológicas, como a imunoglobulina A, que dificulta a aderência de bactérias na cavidade bucal, e a lactoferrina, um agente bactericida, que inibe a infecção bacteriana em indivíduos saudáveis (BAGG, 1999; van't HOF, 2014).

No paciente que se encontra em tratamento intensivo, dentre outros fatores, há uma diminuição do fluxo salivar, o que pode levar à colonização da orofaringe por patógenos respiratórios, podendo levar a PAVM (BAGG, 1999). Entre outras alterações, maior formação de placa dental (JONES, 2011).

3.3 Mudança de microbiota da cavidade bucal e do trato respiratório

Apesar de a cavidade oral possuir uma microbiota, esta pode sofrer alterações, deixando o paciente mais susceptível à infecções. Pacientes que apresentam acidose, uremia, diabetes mellitus descompensada, hipotensão,

leucocitose, leucopenia e estímulos possuem, frequentemente, uma colonização maior nessas regiões. Além dos fatores endógenos, a microbiota sofre alteração durante o uso de equipamentos respiratórios contaminados, higiene bucal precária ou ausente, dietas enterais, contato direto e indireto com outros pacientes (transmissão cruzada) e baixa adesão à higiene das mãos pelos profissionais envolvidos (MEDEIROS, 2005).

3.4 Prevenção de PAVM

Embora a higiene bucal seja uma prática tradicional na assistência ao paciente, até recentemente não havia evidências científicas de sua relevância para a prevenção de infecções hospitalares. A higiene bucal é uma medida que reduz a incidência de PAVM (BERALDO E ANDRADE, 2008).

Se o paciente intubado não receber higiene bucal eficaz, o cálculo dentário, formado por depósitos de bactérias, se estabelece dentro de 72 horas. Podendo ocorrer a microaspiração destes patógenos até o trato respiratório inferior, e posteriormente, pneumonia (BERRY E DAVIDSON, 2006).

Vários aspectos comprometem a higienização da cavidade bucal e favorecem ainda mais o crescimento microbiano, como a dificuldade e/ou impossibilidade do autocuidado, a presença do tubo traqueal, que dificulta o acesso à cavidade bucal, e a conseqüente formação de biofilme dental (FOURRIER , 2000).

A utilização de enxaguantes bucais na higiene da cavidade bucal tem sido cada vez mais utilizada, assim como na remoção do biofilme dental (BERALDO E ANDRADE, 2008).

A solução de clorexidina é o principal agente usado na prevenção contra a pneumonia nas unidades de terapia intensiva, na antisepsia da via aérea superior e inferior (SEMENOFF , 2008). E tem sido objeto de muitas pesquisas em pacientes ventilados mecanicamente, por ser um agente antimicrobiano com amplo espectro de atividade, sendo absorvida pelos tecidos, ocasionando um efeito residual ao longo do tempo (ELDRIDGE , 1998; KOEMAN , 2006). No Brasil a clorexidina é mais encontrada em enxaguantes bucais na concentração de 0,12% podendo ser utilizada também na concentração de 0,20% (MARINHO E ARAÚJO, 2007).

3.5 Clorexidina

3.5.1 Descrição e propriedades

A clorexidina {1,1'-bis Hexametileno (5-[p-clorofenil] biguanida)} é uma biguanida catiônica que foi sintetizada em 1950, na Inglaterra, por pesquisas voltadas no combate à malária. Em 1953, o cloridrato de clorexidina foi desenvolvido e introduzido como um antisséptico, e apenas na década de 70, destacou-se por ser um antisséptico de baixa toxicidade, afinidade química com as estruturas da pele e mucosa, possuir largo espectro, eficaz contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de apresentar ação bactericida e bacteriostática, agindo também sobre alguns fungos e vírus como, por exemplo, o HIV (TORTORA, 2000; DENTON, 2001).

A clorexidina possui duas principais formas de atuação, proveniente de dois tipos de sais: como digluconato ou dicloridrato (LINDHE, 1999). O digluconato de clorexidina dá origem às substâncias farmacêuticas de uso corrente pelos laboratórios em produtos para as mais variadas aplicações de uso humano, tais como: colírios, cremes e pomadas associadas de uso dermatológico, produtos para uso ginecológico, etc. No âmbito hospitalar, os degermantes antissépticos são destinados à desinfecção de mãos e feridas, e limpeza da pele e das mucosas antes de cirurgias ou outros procedimentos de contato ou invasivos (BAILEY, 2011).

A clorexidina é utilizada em várias áreas como, por exemplo, na odontologia, farmacêutica, medicina veterinária e principalmente na medicina em especialidades, como, neonatologia e obstetrícia, ginecologia, cardiologia, urologia, oftalmologia, entre outras, além do controle da infecção hospitalar (BAILEY, 2011).

3.5.2 Mecanismo de ação

O modo de ação da clorexidina caracteriza-se pela ligação à parede bacteriana. A clorexidina adsorve-se a compostos aniônicos como glicoproteínas salivares, radicais fosfatados e carboxílicos presentes em bactérias e polissacarídeos extracelulares presentes na mucosa (RÖLLA e MELSEN, 1975).

O fato da molécula catiônica da clorexidina ser rapidamente atraída pela carga negativa da superfície bacteriana faz com que seja adsorvida à membrana celular por interações eletrostáticas, provavelmente por ligações hidrofóbicas ou por pontes de hidrogênio, essa adsorção é concentração dependente, sendo bacteriostática em baixas concentrações e bactericida em concentrações elevadas. Assim, em dosagens elevadas, ela causa precipitação e coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana e, em doses mais baixas, a integridade da membrana celular é alterada, resultando num extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular (HUGO e LONGWORTH, 1964; RÖLLA e MELSEN, 1975).

3.5.3 Espectro de ação

A clorexidina mostrou ser ativa em baixas concentrações contra um grande número de bactérias Gram-positivas e Gram negativas e fungos como, por exemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Cândida albicans* (TORTORA, 2000).

Não há evidências de surgimento de resistência bacteriana à clorexidina, apenas a ocorrência de um pequeno aumento na concentração mínima necessária para inibir o crescimento de certos microrganismos. Esta característica é particularmente importante, pois oferece uma alta eficácia no seu uso antibacteriano, não encontrado em outros biocidas normalmente usados para a mesma finalidade. A clorexidina é um biocida eficaz e econômico, não necessitando rodízio (GILBERT E MCBAIN, 2003). Por outro lado a resistência tem chamado a atenção, principalmente de bactérias de pele, onde a clorexidina é usada para assepsia em procedimentos cirúrgicos. Em um estudo sueco, cinco genes de resistência foram encontrados em *Staphylococcus* coagulase-negativos, identificados como qacA/B, smr, qacH, qacJ, e qacG. Esses genes foram identificados em bactérias que estavam relacionadas a infecção do sítio cirúrgico (PRAG, 2014).

3.5.4 Efeitos Adversos

A clorexidina é estável, não é tóxica aos tecidos e a absorção pela mucosa e pele é mínima, é bem tolerada quando administrada em animais por via parenteral e intravenosa, parece não atravessar a barreira placentária e não provoca efeitos tóxicos colaterais sistêmicos (DAVIES E HULL, 1973; WINROW, 1973; CASE, 1977; RUSHTON, 1977).

Embora a clorexidina seja um dos mais ativos e eficazes agentes antissépticos e considerada “*gold standard*”, não está livre de efeitos adversos indesejáveis (FLÖTRA, 1971). Na odontologia pode apresentar como efeitos adversos alterações das papilas gustativas e descoloração do esmalte dentário (HELMS, 1995; AUTIO-GOLD, 2008).

Nas últimas décadas, os relatos de reações do tipo imediato à clorexidina atingindo desde urticária localizada a choque anafilático começaram a aparecer com mais frequência (HEINEMANN, 2002). GULERI e colaboradores (2012) confirmaram a clorexidina como agente causal e concluíram que o uso extensivo de clorexidina para reduzir infecções hospitalares tem a potência para sensibilizar uma pequena proporção de pacientes, levando ao risco de vida por anafilaxia em exposição subsequente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Tipo de estudo

Este é um estudo prospectivo, duplo cego (paciente e profissional que fará limpeza da cavidade bucal), randomizado, descritivo com acompanhamento longitudinal de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, durante o período de Junho 2014 até Março de 2015. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Evangélica do Paraná (CAAE: 31506514.0.0000.0103) (ANEXO A).

Como estudo descritivo microbiológico, não foi possível calcular o tamanho amostral, pois não havia uma hipótese analítica comparativa.

4.2 Critérios de Inclusão

Foram incluídos pacientes admitidos na UTI sob ventilação mecânica com tempo de hospitalização inferior a 48 horas; maiores de 18 anos de idade; sem previsão de sair de ventilação mecânica por, no mínimo, 48 horas; ter dentes permanentes anteriores ou posteriores naturais; não apresentar cálculo dentário ou restaurações rugosas nos dentes anteriores e termo de consentimento livre e esclarecido assinado por um representante legal (ANEXO B).

4.3 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os pacientes que não concordaram com o termo livre esclarecido; idade inferior a 18 anos; internamento prolongado prévio à UTI; que se submeteram a tratamento com antibióticos na última semana; paciente internado na UTI com suspeita clínica de pneumonia ou após internamento superior a 48 horas. Uso de antibióticos, que poderiam interferir na microbiota oral, não foram critérios de exclusão.

4.4 Intervenção

Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram alocados, ao acaso, em dois grupos (clorexidina ou placebo). Após obtenção do TCLE do paciente pelo responsável legal, os pacientes foram aleatorizados (randomizados). A intervenção que foi utilizada para comparar os grupos foi a higienização da cavidade bucal com ou sem clorexidina. A higienização da cavidade bucal foi realizada pela equipe de enfermagem previamente treinada por um dentista aplicando-se 15 mL da solução de clorexidina 2% com suavidade, na gengiva, na mucosa bucal e na língua. Não houve limpeza mecânica por uso de escova dental. A solução era aspirada após o término da higienização. No grupo placebo, a limpeza foi realizada apenas com solução salina isotônica. A higienização foi realizada diariamente até o paciente ter alta da UTI.

4.5 Dados clínicos

Dados clínicos foram avaliados, incluindo idade, sexo, comorbidades, progressão para PAVM durante o estudo e até 7 dias após a última cultura colhida. Para análise de comorbidades, foram avaliadas aquelas relacionadas ao escore de Charlson, que inclui diabetes mellitus, insuficiência renal crônica, infarto do miocárdio prévio, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, demência, doença pulmonar obstrutiva, hipertensão arterial sistêmica, neoplasias sólidas, linfoma, leucemia, doença reumatológica, úlcera péptica, hepatopatia e imunossupressores.

4.6 Amostras biológicas

Foram coletadas amostras de mucosa bucal (OM) por meio de uma haste com a ponta revestida de algodão (*swab*) e do biofilme dental (DP) por curetagem por um dentista. A primeira amostra (tempo zero) foi coletada imediatamente após a

admissão na UTI e, em seguida, nos dias 3, 5, 7 e 10. A primeira amostra foi colhida antes da aplicação da clorexidina. As amostras foram coletadas 6 horas após a higiene bucal e foram imediatamente encaminhadas para o laboratório de microbiologia para cultivo.

O meio de cultura padrão usado para a semeadura inicial (direto da amostra) foi ágar sangue e MacConkey. As bactérias foram selecionadas conforme as características das colônias. Depois de ter as colônias suspeitas isoladas, foi realizada a identificação. Testes de identificação e de susceptibilidade foram realizados utilizando método automatizado (Vitek 2®, Biomeriueux, EUA) ou manual de acordo com a CLSI M100-S24 (CLSI 2014). Foram analisadas apenas bactérias relacionadas com PAVM. A classificação de resistência (resistência a múltiplas drogas, resistência estendida e pan-resistência) foi feita de acordo com critérios definidos previamente por MAGIORAKOS (2012). A presença de carbapenemase e beta-lactamases de espectro estendido em enterobactérias foi realizada por meio de testes fenotípicos (AREND 2015). Apenas para facilitar a descrição dos resultados, foram denominadas de KPC todas *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemase pelo teste fenotípico, CESP as bactérias do gênero *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*.

4.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de clorexidina e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A técnica a seguir foi descrita por NERANDZIC (2015). Uma solução concentrada de 50 mg/mL de digluconato de clorohexidina (CHX; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) foi preparado com água ultrapura. Esta solução foi diluída para se obter volumes de 100 mL a 2,5 mg/mL (0,25%), 1,25 mg/mL (0,12%); 0,65 mg/mL (0,065%); 0,31 mg/mL (0,031%); 0,15 mg/mL (0,015%); 0,078 mg/mL (0,0078%); e 0,039 mg/mL (0,0039%).

As bactérias foram cultivadas aerobicamente em placas com ágar Mueller-Hinton (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia) a 37 °C durante 24h. Colônias foram obtidas da cultura e suspensas em solução estéril de NaCl 145 mM, até a obtenção

de turbidez equivalente a 0,5 na escala de McFarland (cerca de $1,5 \times 10^8$ CFU/mL). As suspensões bacterianas foram diluídas a uma razão de 1:20 em solução estéril 145 mM de NaCl. Aliquotas de cinquenta microlitros de cada suspensão bacteriana foram transferidas para microtubos de 1,5 mL (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) e centrifugado a 10000 xg durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram descarregados por inversão do tubo e 500 µL de alíquotas de cada solução com diferente concentração de CHX foram adicionados a cada tubo. Os sedimentos foram suspensos em vórtex durante 10 segundos. As suspensões finais foram incubadas a 37 ° C. Para verificar a atividade antimicrobiana imediata e de longa duração, foram avaliadas as amostras em 1h e em 12h. Após 1h (T1h) e 12h (T12h). O T12h foi usado para avaliar o efeito residual, uma vez que a aplicação da solução de clorexidina nos pacientes era a cada 12 horas. As soluções foram dispostas em microtubos e centrifugadas (10000 x g durante 5 minutos) e os sedimentos foram lavados com NaCl 145 mM. Este procedimento foi repetido mais duas vezes para remoção da CHX. Após a última centrifugação, os sedimentos foram suspensos com 300 µL de caldo de Mueller-Hinton (Himedia Laboratories, Mumbai, Índia). Volumes foram transferidos para placas de 96 poços para microtitulação (K30-5096U; Kasvi Prod Equip Lab, Curitiba, Brasil) e aerobicamente incubados a 37 ° C, por 24-48h.

A ausência de sedimentos bacterianos foi indicativa do efeito inibitório e a concentração mais baixa a atingir tal efeito foi considerada como a concentração inibitória mínima (CIMCHX). A suspensão que atingiu a CIMCHX foi separada para realização da concentração bactericida mínima (CBMCHX). Alíquotas de 10 µL foram plaqueadas em superfícies de ágar Muller-Hinton. As placas foram devidamente incubadas por 48h. A ausência de crescimento bacteriano foi indicativa de efeito bactericida e a menor concentração a atingir tal efeito foi considerada como a CBMCHX. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata, em três momentos independentes. Testes com os controles negativos foram realizados em paralelo (NaCl 145 mM). Foram usados como controles as concentrações 0%.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados por meio de análise descritiva ou analisados e comparados cujo nível de significância das diferenças foi de $\alpha = 95\%$ ou $p \leq 0,05$. Os testes estatísticos foram utilizados conforme o tipo de variável assim como a possibilidade de correlação de tempo, podendo ser utilizados os testes de qui-quadrado ou correlação de Pearson, assim como Mann-Whitney para mediana entre as amostras. Foi calculado o risco relativo (RR) com um intervalo de confiança de 95% (95% IC). Toda a análise estatística foi realizada com o programa SPSS 18.0. A correlação entre a amostra colhida de OM e DP foi analisada pelo index de kappa.

5 RESULTADOS

5.1 Dados clínicos

Vinte e oito pacientes preencheram os critérios de inclusão. Porém, 12 pacientes foram excluídos por não possuírem, pelo menos, 4 coletas de cultura. Foram, então, incluídos 8 pacientes em cada grupo.

As características dos 16 pacientes incluídos estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas e resultados de culturas de swab bucal e biofilme dentário de pacientes admitidos na UTI e em diferentes dias de ventilação mecânica.

N	CONTROLE								CLOREXIDINA							
	1	3	5	7	10	11	12	14	2	4	6	8	9	13	15	16
Sexo	M	F	M	M	F	F	M	F	M	M	F	M	M	F	F	M
Idade	43	19	31	56	19	83	50	41	65	65	60	51	37	46	55	46
Doença de base	Não	Não	Não	AVC	Não	Diabete	Não	Câncer	Cirrose	Não	AVC	Câncer	Não	Não	HAS	Renal Crônico
Charlson Index	0	0	0	2	0	1	0	2	1	0	3	2	1	0	0	2
Antibiótico*	CAZ/ VAN	CFZ/ MEM/ VAN	CRO/ AMK	MEM/VAN /COL	CFZ/ MEM/ VAN	CIP	MEM/ VAN	None	None	PIP/CAZ /MEM/V AN	CRO	CRO/VAN	VAN/ MEM/ COL	CRO/ MEM/ VAN	CRO	None
Bucal	MRSA	CESP	KPC	MRSA CRAB	MRSA	-	Kleb	MRSA Kleb	MRSA	-	CESP Kleb	CSAB	CSPA	-	Kleb	-
Dia 0																
Dente	MRSA KPC	-	KPC	CRAB	MRSA CRAB	MRSA	CRAB	MRSA	-	Kleb	CESP	CSAB	CSPA	-	Kleb	CSAB
Bucal	MRSA	CESP	KPC	CRAB	MRSA CRAB	MRSA	CRAB	Kleb	-	MRSA	MSSA	CSAB	CSPA CRAB	-	MSSA Kleb	CSAB CSPA
Dia 3																
Dente	MRSA	CESP	KPC	CRAB	MRSA CRAB	MRSA	CRAB	MRSA Kleb	Cand	MRSA	CESP	CSAB	CSPA CRAB	-	MSSA Kleb	CSAB
Bucal	MRSA KPC	MRSA	KPC CRAB	CRAB	MRSA CRAB Prot	MRSA	MRSA CRAB	MRSA	MSSA	MRSA CRAB	CESP	CSAB MRSA	CRAB	Cand	-	CESP CSPA
Dia 5																
Dente	MRSA KPC	MRSA CRAB KPC	KPC	CRAB	MRSA CRAB Prot	MRSA	MRSA CRAB	Kleb	MSSA	MRSA CRAB	CESP	CSAB MRSA	Steno	Cand	MSSA Kleb	CSPA
Bucal	MRSA KPC	MRSA CRAB KPC	KPC CRPA	KPC	MRSA CRAB Prot	MRSA Prot	MRSA CRAB	MRSA Kleb	-	MRSA CRAB	CESP	CSAB	CRAB	Cand	MSSA	CSAP
Dia 7																
Dente	MRSA KPC	MRSA CRAB KPC	KPC	KPC CRAB	MRSA CRAB Prot	MRSA Prot	MRSA CRAB	Kleb	MSSA	MRSA CRAB	CESP	CSAB Kleb	CRAB	Cand	MSSA	CSPA CESP
Bucal	MRSA CRAB	MRSA KPC	KPC	MRSA CRAB	NR	Prot	MRSA CRAB	NR	MSSA	MRSA	-	CSAB MRSA	MRSA CRAB	CSAB CESP	Kleb	CSPA
Dia 10																
Dente	MRSA CRAB	MRSA KPC	KPC	MRSA CRAB	NR	Prot	MRSA CRAB	NR	MSSA	MRSA	-	Kleb	MRSA CRAB	CSAB CESP	MSSA	CSPA

Fonte: Os autores (2015). AVC = acidente vascular cerebral; HAS = Hipertensão arterial Sistêmica; MRSA = meticillin resistant Staphylococcus aureus; MSSA = meticillin susceptible Staphylococcus aureus; Kleb = Klebsiella spp não produzida de carbapenemase; CSPA = carbapenem susceptible Pseudomonas aeruginosa; CRPA = carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa; CESP (Citrobacter, Enterobacter, Serratia ou Providencia); CSAB = carbapenem susceptible Acinetobacter baumannii; CRAB = carbapenem resistant Acinetobacter baumannii; KPC = Klebsiella produtora de carbapenemase; Cand = Candida spp.

A idade média dos pacientes foi 47,9 anos, sendo 42,75 no grupo placebo e 53,13 no grupo clorexidina ($p=0,229$). No grupo solução de clorexidina foram 5 homens (62,50%) e, no grupo placebo, 4 homens (50,00%) ($p = 0,500$). Não houve diferenças no escore de morbidades (Charlson) tanto no placebo quanto na clorexidina, respectivamente, 0,62 vs. 1,12 ($p = 0,619$).

Nenhum paciente recebeu antibiótico no momento de admissão conforme os critérios de inclusão. Porém, antibióticos foram administrados ao longo dos dias conforme indicação médica e não houve influência do pesquisador na escolha e indicação dos antibióticos conforme apresentado na Tabela 2. Em três pacientes não foi utilizado antibióticos e o perfil de bactérias não foi multirresistente em 1 deles, em outro foi identificado MRSA em apenas uma amostra e noutro apenas MRSA.

Tabela 2 – Antibióticos prescritos e bactérias identificadas em pacientes submetidos a higienização bucal com CHX ou placebo.

N	CHX*	Gênero	Idade	Antibióticos usados	Bactérias identificadas
1	Não	Masculino	43	CAZ/VAN	MRSA, KPC, CRAB
3	Não	Feminino	19	CFZ/MEM/VAN	CESP, MRSA, CRAB, KPC
5	Não	Masculino	31	CRO/AMK	KPC, CRAB
7	Não	Masculino	56	MEM/VAN/COL	CRAB, MRSA, KPC
10	Não	Feminino	19	CFZ/MEM/VAN	MRSA, CRAB, Prot
11	Não	Feminino	83	CIP	MRSA, Prot
12	Não	Masculino	50	MEM/VAN	CRAB, Kleb, MRSA
14	Não	Feminino	41	None	MRSA, Kleb
2	Sim	Masculino	65	None	MRSA, MSSA, Cand
4	Sim	Masculino	65	PIP/CAZ/MEM/VAN	Kleb, MRSA, CRAB
6	Sim	Feminino	60	CRO	CESP, Kleb, MSSA
8	Sim	Masculino	51	CRO/VAN	CSAB, MRSA, Kleb
9	Sim	Masculino	37	VAN/MEM/COL	CSPA, CRAB, Steno, MRSA
13	Sim	Feminino	46	CRO/MEM/VAN	Cand, CSAB, CESP
15	Sim	Feminino	55	CRO	Kleb, MSSA
16	Sim	Masculino	46	None	CSAB, CESP, CSAP

* CHX - Clorexidina

CAZ - Ceftazidima; VAN - Vancomicina; CFZ - Cefazolina; MEM - Meropenem; CRO - ceftriaxona; AMK - ampicilina; COL - colistina; CIP - ciprofloxacino; PIP - piperacilina/tazobactam

Fonte: Os autores (2015). MRSA = meticillin resistant Staphylococcus aureus; MSSA = meticillin susceptible Staphylococcus aureus; Kleb = Klebsiella spp não produtora de carbapenemase; CSPA = carbapenem susceptible Pseudomonas aeruginosa; CRPA = carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa; CESP (Citrobacter, Enterobacter, Serratia, Providencia); CSAB = carbapenem susceptible Acinetobacter baumannii; CRAB = carbapenem resistant Acinetobacter baumannii; KPC = Klebsiella produtora de carbapenemase

5.2 Culturas

A primeira cultura obtida da cavidade bucal foi negativa (não houve desenvolvimento de bactérias patogênicas) em 4 pacientes e em 3 pacientes na cultura de biofilme. No dia 5, todos os pacientes apresentaram cultura positiva.

Na admissão, 7 pacientes já apresentaram bactérias MDR, incluindo uma *Klebsiella pneumoniae*, produtora de carbapenemase, do tipo KPC, a qual se perpetuou durante todo o estudo. *Staphylococcus aureus* foi a principal bactéria, seguida de *Acinetobacter baumannii*. Ambas as espécies foram identificadas mais frequentemente como MDR.

As bactérias identificadas em cavidade bucal e no biofilme dentário estão descritas no Gráfico 1 e na Tabela 1.

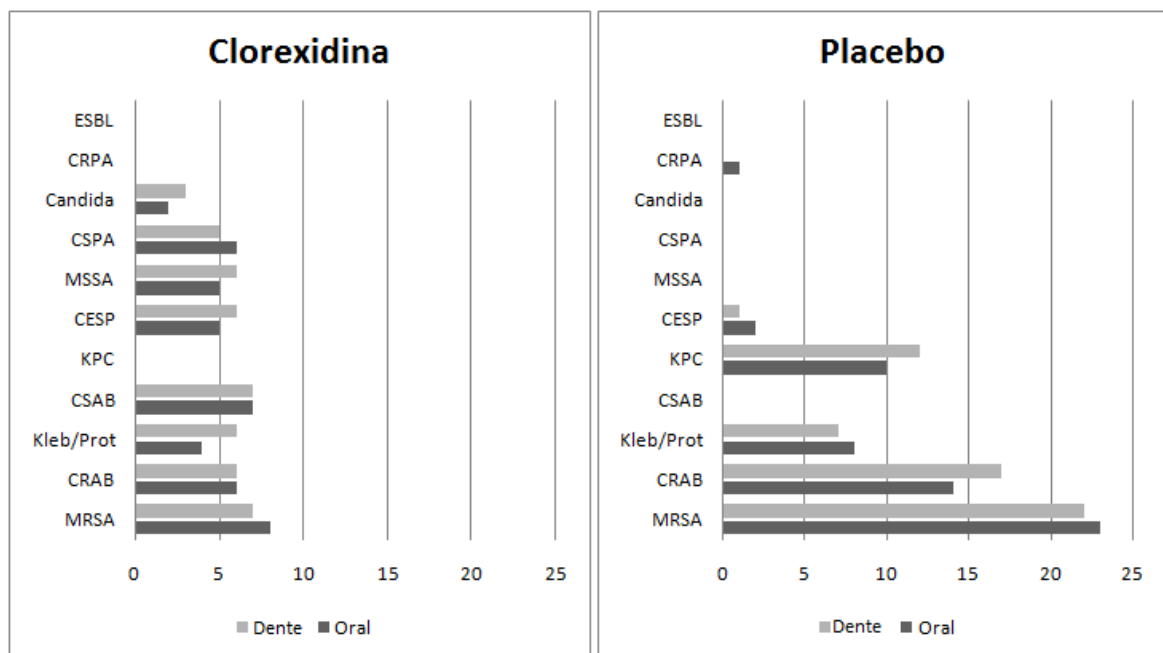


Gráfico 1: Espécies identificadas na cultura do swab bucal (Oral) e biofilme dentário (Dentes). No eixo horizontal está representado o número de culturas, e no eixo vertical, as bactérias identificadas.

Fonte: Os autores (2015). MRSA = meticillin resistant *Staphylococcus aureus*; MSSA = meticillin susceptible *Staphylococcus aureus*; Kleb = *Klebsiella* spp não produtora de carbapenemase; CSPA = carbapenem susceptible *Pseudomonas aeruginosa*; CRPA = carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa*; CESP (Citrobacter, Enterobacter, Serratia, Providencia); CSAB = carbapenem susceptible *Acinetobacter baumannii*; CRAB = carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*

As bactérias MDR, como *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina (MRSA), *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmicos (CRAB), *Klebsiella*

pneumoniae produtora de carbapenemase (KPC), enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos (CRPA) foram mais frequentes do que as bactérias sensíveis, tanto em material de *swab* bucal como em biofilme dentário (tabela 2). Não houve diferença estatística no percentual de MDR em *swab* bucal em relação ao do biofilme dentário.

Tabela 3. Comparação entre pacientes submetidos a higienização bucal com clorexidina ou placebo em relação a perfil microbiológico obtido por *swab* de cavidade bucal ou biofilme dentário.

		Placebo		Clorexidina		RR	95%CI	P
		(n=117)	%	(n=89)	%			
MDR	Total	99/117	86%	57/89	68%	0.81	(0.67-0.98)	0.003
	Oral	48/58	83%	27/43	63%	0.75	(0.58-0.98)	0.011
	Dente	51/59	86%	30/46	65%	0.75	(0.59-0.95)	0.010
GPC	Total	45/117	38%	26/89	29%	0.75	(0.51-1.12)	0.083
	Oral	23/58	40%	13/43	30%	0.76	(0.43-1.32)	0.164
	Dente	22/59	37%	13/46	28%	0.75	(0.42-1.33)	0.165
GNB	Total	72/117	62%	58/89	65%	1.85	(0.85-1.30)	0.296
	Oral	35/58	60%	28/43	65%	1.07	(0.79-1.46)	0.312
	Dente	37/59	63%	30/46	65%	1.04	(0.77-1.38)	0.395
MRSA	Oral	23/58	40%	8/43	17%	0.51	(0.27-0.98)	0.011
	Dente	22/59	37%	7/46	15%	0.47	(0.23-0.92)	0.006
CRAB	Oral	14/58	24%	6/43	14%	0.57	(0.24-1.38)	0.102
	Dente	17/59	29%	6/43	14%	0.48	(0.20-1.12)	0.062

Fonte: Os autores (2015). MDR = multirresistente; GPC = coco Gram-positivo; GNB = Bacilo Gram-negativo; MRSA = *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina; CRAB = *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenêmico; RR = Risco Relativo; CI = intervalo de confiança.

A concordância entre as culturas obtidas pelo *swab* bucal e pelo biofilme dentário também foi avaliada. Para os casos que houve mais de uma bactéria no material, se nenhuma foi idêntica o resultado foi considerado discordante, quando houve pelo menos uma idêntica o resultado foi considerado como concordante. Uma concordância entre os testes foi de 82,5% quando pelo menos uma bactéria foi da mesma espécie e 63,8% quando todas as bactérias identificadas foram coincidentes.

Não foi avaliada a clonalidade entre bactérias da mesma espécie.

5.3 Comparação entre placebo e solução de clorexidina a 2%

Na comparação entre pacientes que usaram solução de clorexidina e o grupo de pacientes que receberam apenas placebo, houveram menos casos de MRSA em pacientes do grupo clorexidina, tanto em *swab* bucal [RR=0,51 (0,27-0,98), $p=0,011$] como em biofilme dentário [RR=0,47 (0,23-0,92), $p=0,006$]. Desta forma, a clorexidina parece ser importante na redução de MRSA, o que não ocorreu com outras espécies (Tabela 3).

A PAVM ocorreu em 4 pacientes no grupo CHX e em 2 pacientes no grupo placebo. Das 6 PAVMs, cinco tiveram cultura quantitativa de aspirado traqueal positiva. As espécies identificadas no aspirado traqueal foram idênticas a aquelas identificadas na cultura de MO e PD em 4 pacientes. Testes de tipagem molecular não foram realizados para verificar se as bactérias apresentavam clonalidade. Dentre as espécies identificadas, foram 2 casos de MRSA, 2 casos de MSSA e 1 caso de *Serratia marcescens*.

5.4 CIM e CBM

Todas as amostras clínicas apresentaram CIM e CBM inferior a menor concentração, que foi de 0,039 mg.mL⁻¹ (0,0039%) em T1h e T12h.

6 DISCUSSÃO

A microbiota da cavidade bucal pode ser modificada por diversos fatores, como interações físico-químicas entre enzimas e microrganismos, redução de saliva e de imunoglobulinas, níveis elevados das enzimas proteases e neuraminidasas associadas a uma higiene bucal precária e gengivites, promovendo a colonização por bactérias Gram negativas (GIBBONS, 1989). Diversas destas condições ficam afetadas em pacientes submetidos a ventilação artificial em UTI, levando a alteração da microbiota habitual e facilitando a colonização por bactérias patogênicas, relacionadas com PAVM.

Neste estudo detectamos a colonização da microbiota bucal tanto em biofilme dentário como em cavidade bucal com bactérias multirresistentes. Isso não significa mudança na microbiota, pois não foi avaliada a microbiota normal, apenas avaliamos bactérias patogênicas. Desde MRSA e até mesmo um caso de enterobactéria resistente a carbapenem foram identificados precocemente. A probabilidade destes pacientes estarem previamente colonizados não pode ser descartada, embora seja pouco provável para uma enterobactéria produtora de carbapenemase, uma vez que esta bactéria é raramente encontrada na comunidade. Para MRSA, a colonização domiciliar pode acontecer (CHENG, 2004; ABUDU, 2001).

A presença de bactérias diferente da microbiota habitual na cavidade bucal, como bacilos Gram-negativos e *S. aureus* pode acontecer em pacientes hospitalizados, como descrito previamente, em 16 a 57%. Este mesmo estudo da década de 70 mostrou que essa situação é extremamente rara em pacientes saudáveis (até 2%) (JOHANSON, 1969). Outros pesquisadores encontraram dados similares em pacientes de UTI na década de 80 e 90 (VALENTI, 1978; SCANNAPIECO, 1992).

Uma das questões mais instigantes diz respeito a correlação entre as bactérias identificadas na cavidade bucal com aquelas de material obtido da via aérea inferior e também daquelas identificadas nos pacientes com PAVM (BRENNAN 2004). Estes dados tem sido avaliados em alguns estudos com resultados bastante diferentes (BONTEN, 1996; GARROUSTE-ORGEAS, 1997; FOURRIER, 1998; SCANNAPIECO, 1992; DONALDSON, 1991; SOLE, 2002; TORRES, 1993). Na admissão, 63% (23 a 96%) dos pacientes podem estar

colonizados com um agente patogênico associado com PAVM. Dos pacientes que não estão colonizados, 63% também acabam adquirindo um patógeno associado a PAVM durante a permanência na UTI. No presente estudo estes percentuais foram superiores a alguns destes estudos, sendo que 75% já apresentavam um patógeno associado com PAVM na admissão e 100% estavam colonizados com um patógeno associado com PAVM em até 10 dias.

Nos mesmos estudos citados anteriormente, a concordância da mesma espécie que colonizava a cavidade bucal com aquela identificada em lavado broncoalveolar foi desde 0 até 97%. FELDMAN (1999) demonstrou em um pequeno estudo que a colonização da via aérea inferior é precedida da colonização da cavidade bucal, traqueia e trato digestório alto.

As fontes de transmissão de bactérias multirresistentes são bem conhecidas no ambiente hospitalar. No presente estudo, a transmissão pode ter acontecido no momento da intubação orotraqueal ou durante procedimento de aspiração de vias aéreas ou cavidade bucal, conforme já foi observado em estudo prévio (ROCK, 2014). Não avaliamos o perfil clonal das bactérias do raspado dentário com a da cavidade bucal. No presente estudo também não foi avaliada a história recente de internação em outros hospitais, assim como visitas a serviços de emergência e uso de antibióticos, que poderiam justificar uma cultura precocemente positiva por bactérias multirresistentes. Os pacientes hospitalizados não receberam antibióticos na primeira coleta. Porém, nas coletas subsequentes, alguns pacientes receberam antibióticos, muitos deles de amplo espectro. Esse fato pode ter influenciando a mudança na microbiota, conforme outros autores já descreveram (WILLING, 2011)

Além de precoce, ficou claro que a colonização persistiu ao longo dos dias na maioria dos pacientes. Os motivos pelos quais a colonização persiste ou muda depende de muitos fatores intrínsecos e extrínsecos. A utilização de antibióticos, a pressão seletiva de outros microrganismos, as condições higiênicas da cavidade oral e fatores imunológicos locais podem interferir. Pacientes em estado crítico apresentam elevados níveis da protease, a qual remove das superfícies dos dentes uma substância protetora denominada fibronectina (glicoproteína inibidora da aderência de bacilos Gram-negativos à orofaringe). A perda dessa substância facilita a fixação de bactérias Gram-negativas, inclusive de *Pseudomonas aeruginosa* nas células epiteliais da faringe (MEDEIROS, 2005).

Em pacientes de UTI, o perfil microbiano encontrado dependerá do tempo de internação, do uso de antimicrobianos, da susceptibilidade do hospedeiro e da microbiota da UTI. Bacilos Gram-negativos (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp., *Acinetobacter* spp.) e *Staphylococcus aureus* são frequentemente isolados (BASSIN E NIEDERMAN, 1995; GEORGE, 1995). No nosso estudo ficou evidente que nos pacientes que não usaram antibióticos, o perfil das bactérias não foi de multirresistência, ficando sugerido aqui o papel da pressão seletiva induzida pelos antibióticos na microbiota bucal.

Pacientes internados em UTI apresentam uma quantidade de biofilme dental aumentada proporcional ao tempo de internação, ocorrendo um aumento na probabilidade desse biofilme ser colonizado por patógenos respiratórios e da aspiração desse conteúdo para os pulmões, ocasionando a pneumonia (SATO, 2009).

Neste estudo evidenciou-se uma forte correlação de espécies identificadas no raspado de biofilme com os achados em cavidade bucal. O acúmulo de bactérias da microbiota bucal sobre a superfície dos dentes é uma das explicativas para a cavidade bucal e a biofilme dental apresentarem os mesmos patógenos (GOMES, 2010; EWAN, 2010). A formação do biofilme na superfície dentária tem sido estudada *in vitro* e *in vivo* (KOLENBRANDER, 2010). Cada passo na formação desse biofilme é bastante específico e apresenta características estruturais e diferente espécies daquelas encontradas na mucosa bucal, pelo menos em pacientes saudáveis. (SOCRANSKY, 2005; ZIJNGE, 2010; NOBBS, 2009).

A higiene bucal é um fator importante na prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica (PAVM). Frente às limitações dos métodos mecânicos de higiene, agentes antimicrobianos em forma de enxaguantes bucais são amplamente utilizados no controle do biofilme, auxiliando os métodos mecânicos de remoção e diminuindo o número de microrganismos patogênicos na cavidade bucal (MARINHO E ARAÚJO, 2007). Ficou evidente a redução no número total de bactérias no grupo que recebeu a solução de clorexidina em relação ao grupo placebo, além de uma redução significativa de MRSA, corroborando com o perfil de suscetibilidade já conhecido deste antisséptico para *Staphylococcus aureus*. Por outro lado, não foi vista mudança no perfil de bacilos Gram-negativos.

Diante da persistência de pacientes colonizados por bacilos Gram-negativos, foi realizado o teste de suscetibilidade das bactérias identificadas à clorexidina. Os

resultados mostraram que todas as bactérias apresentaram CIM bastante reduzidas. Diante da dúvida sobre a atividade bactericida e não simplesmente da ação bacteriostática foram realizados os testes de CBM, cujos resultados comprovaram a alta sensibilidade dos patógenos à clorexidina. Não foi possível comparar CIM e CBM entre os grupos (placebo e CHX), pois foram todos abaixo do valor mínimo. Isso demonstra que a solução de clorexidina é um antisséptico efetivo. Um dos principais mecanismos da resistência do biofilme está relacionado à falha dos agentes penetrarem em toda sua extensão. Substâncias que compõem a matriz do biofilme retardam a difusão de substâncias químicas e antimicrobianas. A velocidade de penetração varia de acordo com o microrganismo envolvido e a composição da matriz. Um segundo mecanismo de resistência está relacionado com a capacidade dos microrganismos, presentes no interior do biofilme, ficarem por longos períodos sem nutrição, diminuindo sua taxa de crescimento. Microrganismos com baixa taxa de crescimento, não são muito suscetíveis às substâncias químicas (STOODLEY, 2002).

A suposição para a ineficácia da clorexidina para determinados microrganismos, deve-se ao fato da vitalidade bacteriana permanecer na parte interna do biofilme. Sendo assim, indica a necessidade da remoção mecânica prévia do biofilme para eficácia da solução de clorexidina (PRATTEN, 1998)

O CDC (Centro de Controle e Prevenção de Doenças) sugere a implantação de um programa que contemple a higiene bucal e a descontaminação desta cavidade com antissépticos em pacientes com quadro agudo, internados em instituições de longa permanência e com risco aumentado para a pneumonia hospitalar (TABLAN, 2004). Embora a clorexidina reduza a colonização bacteriana na cavidade bucal e, conseqüentemente, a prevalência de PAVM e de pneumonia pós-cirúrgica, sua influência na redução da mortalidade associada a essas condições ainda não foi totalmente esclarecida (CHLEBICKI E SAFDAR, 2007).

Dentre as limitações do nosso estudo, incluímos o número reduzido de pacientes que não nos permitiu avaliar se a solução de clorexidina 2% mudaria a incidência de PAVM. A identificação não quantitativa de bactérias, não permitindo avaliar se o número de unidades formadoras de colônias mudou durante o tempo e entre os grupos. Outro questionamento diz respeito a determinação da CIM e CBM para clorexidina pois não foi usado um controle resistente.

7 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a cavidade bucal e o biofilme dental se colonizam precocemente nos pacientes admitidos na UTI, geralmente por bactérias multirresistentes. Os agentes etiológicos identificados no biofilme dental apresentam alta correlação com aqueles identificados na cavidade bucal.

O uso da solução de clorexidina a 2% na higienização da cavidade bucal não mudou a colonização por bacilos Gram-negativos, mas mostrou-se efetiva na redução de colonização por *Staphylococcus aureus*.

Embora a solução de clorexidina a 2% não tenha sido efetiva na redução de bacilos Gram-negativos, o perfil de sensibilidade de todos os microrganismos testados foi alto. Isto demonstra que a falha deste antisséptico na redução de patógenos associados com PAVM na cavidade bucal não está na sensibilidade, mas provavelmente pela ineficácia local pela presença de biofilme ou outro mecanismo desconhecido.

8 REFERÊNCIAS

ABUDU, L; BLAIR, I; FRAISE, A; CHENG, KK. Methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA): a community-based prevalence survey. **Epidemiol Infect.**, v.126, n.3, p.351-356, jun. 2001.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITARIA (ANVISA). ORIENTAÇÕES PARA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE. 2009

AMARAL, S. M.; CORTÊZ, A. Q.; PIRES, F. R. Pneumonia Nosocomial: importância do microambiente oral. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v. 35, n. 11, São Paulo, 2009.

AREND LN, PILONETTO M, SIEBRA CDE A, TUON FF. Phenotypic and molecular characterization of 942 carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) in southern Brazil. **J Infect Chemother**. 2015 Apr;21(4):316-8.

AUTIO-GOLD, J. The role of chlorhexidine in caries prevention. **Oper Dent**. 2008 Nov-Dec;33(6):710-6.

BAGG, J. E. The oral microflora and dental plaque. *Essentials of microbiology for dental students*. **Oxford: Oxford University Press**. p 229-310, 1999.

BAILEY, R.R.; STUCKEY, D.R.; NORMAN, B.A.; DUGGAN, A.P.; BACON, K. M.; CONNOR, D.L.; LEE, I.; MUDER, R.R.; LEE, B.Y. Economic Value of Dispensing Home Based Preoperative Chlorhexidine Bathing Cloths to Prevent Surgical Site Infection. **Inf Cont Hosp Epidem**. v.32, n.5, p.465–471, 2011.

BASSIN, A.S.; NIEDERMAN, M.S. New approaches to prevention and treatment of nosocomial pneumonia. **Semin Thorac Cardiovasc Surg**. v.7, n.2, p.70-77, 1995.

BELLISSIMO, F.; BELLISSIMO, W.; MACHADO V, J.; ALKMIN T, G. C.; NICOLINI, E.; AUXILIADORA-MARTINS, M . Effectiveness of oral rinse with chlorhexidine in preventing nosocomial respiratory tract infections among intensive care unit patients. **Infect. Control Hosp. Epidemiol**. v.30, n.10, p.953-957, 2009.

BERALDO, C.C.; ANDRADE, D. Higiene bucal com clorexidina na prevenção de pneumonia associada à ventilação mecânica. **J Bras Pneumol**. v.34, n.9, p.707-714, 2008.

BERRY, A.M.; DAVIDSON, P.M. Beyond comfort: Oral hygiene as a critical nursing activity in the intensive care unit. **Intensive Crit Care Nurs**, 2006.

BONTEN MJ, BERGMANS DC, AMBERGEN AW, . Risk factors for pneumonia and colonization of respiratory tract and stomach in mechanically ventilated ICU patients. **Am J Respir Crit Care Med** 1996;154:1339-46.

BRENNAN MT, BAHRANI-MOUGEOT F, FOX PC, KENNEDY TP, HOPKINS S, BOUCHER RC, LOCKHART PB.. The role of oral microbial colonization in ventilator-associated pneumonia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology & Endodontics** 2004; 98: 665–672.

ĆABOV. T.; MACAN, D.; HUSEDŽINOVIĆ, I.; ŠKRLIN-ŠUBIĆ, J.; BOŠNJAK,D.; ŠESTAN-CRNEK, S . The impact of oral health and 0.2% chlorhexidine oral gel on the prevalence of nosocomial infections in surgical intensive-care patients: a randomized placebo controlled study. **Wien. Klin. Wochenschr.** v.122, p. 397-404, 2010.

CARVALHO, C.R.R. Pneumonia associada à ventilação mecânica. **J Bras Pneumol.** v.32, n.4, 2006.

CARVALHO, C. R. R.; TOUFEN JUNIOR, C.; FRANCA, S. A. Ventilação Mecânica: princípios, análise gráfica e modalidades ventilatórias. **Jornal brasileiro de pneumologia.** v. 33, São Paulo, 2007.

CASE, DE. Safety of Hibitane. I. Laboratory experiments. **J Clin Periodontol.** v.4, n.5, p.66-72, 1977

CHENG I, . Prevalence of streptococcus pneumoniae and staphylococcus aureus nasopharyngeal colonization in healthy children in the United States. **Epidemiol Infect.** v.132, n.2, p.159-166, apr. 2004

CHLEBICKI, M.P.; SAFDAR, N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator associated pneumonia: a meta-analysis. **Crit Care Med.** v.35, n.2, p.595-602, 2007

CLSI. Clinical & Laboratory Standards Institute: CLSI Guidelines 2014. M100-S24.

CONLEY, P.; MCKINSEY, D.; GRAFF, J.; RAMSEY, A.R. Does an oral care protocol reduce VAP in patients with a tracheostomy? **Nursing.** 2013.

CURTIS MA, ZENOBIA C, DARVEAU RP. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. **Cell Host Microbe.** 2011 October 20; 10(4): 302–306.

DAVIES, R.M.; HULL, P.S. Plaque inhibition and distribution of chlorhexidine in beagle dogs. **J Period Res Suppl.** v.12, p.22-27,1973.

DENTON, G.W. Chlorhexidine.. In: Block, SS., editor. Disinfection, Sterilization, and Preservation. **5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.** p.321-336, 2001.

DONALDSON SG, AZIZI SQ, DAL NOGARE AR. Characteristics of aerobic gram-negative bacteria colonizing critically ill patients. **Am Rev Respir Dis** 1991;144:202-7.

ELDRIDGE, K.R.; FINNIE, S.F.; STEPHENS, J.A.; MAUAD, A.M.; MUNOZ, C.A.; KETTERING, J.D. Efficacy of an alcohol-free chlorhexidine mouthrinse as an antimicrobial agent. **J Prosthet Dent.** v.80, n.6, p.685-90, 1998.

EWAN V, PERRY JD, MAWSON T, MCCRACKEN G, BROWN AN, NEWTON J, WALLS A Detecting potential respiratory pathogens in the mouths of older people in hospital. **Age Ageing.** v.39, n.1, p.122-125, jan. 2010

FEIJÓ, R.D.; COUTINHO, A. P. Manual de prevenção de infecções hospitalares do trato respiratório. **Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar.** 2º ed. São Paulo. 2005.

FELDMAN C, KASSEL M, CANTRELL J, . The presence and sequence of endotracheal tube colonization in patients undergoing mechanical ventilation. **Eur Respir J** 1999;13:546-51.

FLÖTRA, L.; GJERMO, P.; RÖLLA, G.; WAERHAUG, J. Side effects of chlorhexidine mouthwashes. **Scand. J. Dent. Res.** v. 79, p. 119–125, 1971.

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;26:301-8.

FOURRIER, F.; CAU-POTTIER, E.; BOUTIGNY, H.; ROUSSEL-DELVALLEZ, M.; JOURDAIN, M.; CHOPIN, C. Effects of dental plaque antiseptic decontamination on bacterial colonization and nosocomial infections in critically ill patients. **Intensive Care Med.** v.26, n.9. p.1239-1247, 2000.

GARROUSTE-ORGEAS M, CHEVRET S, ARLET G, . Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients. A prospective study based on genomic DNA analysis. **Am J Respir Crit Care Med** 1997;156:1647-55.

GEORGE, D.L. Epidemiology of nosocomial pneumonia in intensive care unit patients. **Clin Chest Med.** v.16, n.1, p.29-44, 1995

GIBBONS, R.J. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. **J Dent Res.** v.68, n.5, p.750-760, 1989.

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J. An evaluation of the potential impact of the increased use of biocides within consumer products upon the prevalence of antibiotic resistance. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 16, p. 189–208, 2003.

GOMES-FILHO IS, PASSOS JS, SEIXAS DA CRUZ S Respiratory disease and the role of oral bacteria. **J Oral Microbiol.** v.21, n.2, dez. 2010.

GRIFFEN AL, BEALL CJ, FIRESTONE ND, GROSS EL, DIFRANCO JM, HARDMAN JH, VRIESENDORP B, FAUST RA, JANIES DA, LEYS EJ. CORE: a phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. **PLoS One.** 2011; 6:e19051.

GULERI, A.; KUMAR, A.; RICHARD, J. M.; HARTLEY, M.; ROBERTS, D. Anaphylaxis to Chlorhexidine-Coated Central Venous Catheters: A Case Series and Review of the Literature. **Surg Infections.** v.13, n.3, p.171-174, 2012.

HEINEMANN, C.; SINAIKO, R.; MAIBACH, H. Immunological Contact Urticaria and Anaphylaxis to Chlorhexidine: Overview. **Exogenous Dermatology.** v.1, n.4, p.186-194, 2002.

HELMS, J. A.; DELLA-FERA, M. A.; MOTT, A. E.; FRANK, M. E. Effects of chlorhexidine on human taste perception. **Arch. Oral Biol.** v. 40, p. 913–920, 1995.

HUGO, W.B.; LONGWORTH, A.R. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. **J Pharm Pharmacol.** v.16, p.655-62, 1964.

HUSSEY HH. AMA Drug Evaluations: The Reference Book for Drug Use. **JAMA,** v.243, n.22, p.2331, 1980.

HUTCHINS, K.; KARRAS, G.; ERWIN, J.; SULLIVAN, K.L. Ventilator-associated pneumonia and oral care: a successful quality improvement project. **Am J Infect Control.** v.37, n.7, p.590-7, 2009.

JOHANSON WG, PIERCE AK, SANFORD JP. Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients. Emergence of gram-negative bacilli. **N Engl J Med** 1969;281:1137-40.

JOHNSON BT. Uses of chlorhexidine in dentistry. **Gen Dent.** 1995 Mar-Apr;43(2):126-32, 134-40.

JONES, D.J.; MUNRO, C.L.; GRAP, M.J. Natural history of dental plaque accumulation in mechanically ventilated adults: a descriptive correlational study. **Intensive Crit Care Nurs.** 2011 Dec;27(6):299-304.

KOEMAN, M.; VAN DER VEN, A. J.; HAK, E.; JOORE, H.C.; KAASJAGER, K.; DE SMET, A.G . Oral decontamination with chlorhexidine reduces the incidence of ventilator-associated pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med.** v.173, n12, p.1348-1355, 2006.

KOLENBRANDER PE, PALMER RJ JR, PERIASAMY S, JAKUBOVICS NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. **Nat Rev Microbiol.** 2010; 8:471–480.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N.P. **Tratado de periodontia clinica e implantologia oral.** Guanabara Koogan, p.342-46. Rio de janeiro, 1999.

LORENTE L.; LECUONA.; JIMÉNEZ A.; PALMERO S.; PASTOR E.; LAFUENTE, N . Ventilator-associated pneumonia with or without toothbrushing: a randomized controlled trial. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.** v.31, p. 2621-2629, 2012.

MAGIORAKOS AP, SRINIVASAN A, CAREY RB, CARMELI Y, FALAGAS ME, GISKE CG, HARBARTH S, HINDLER JF, KAHLMETER G, OLSSON-LILJEQUIST B, PATERSON DL, RICE LB, STELLING J, STRUELENS MJ, VATOPOULOS A, WEBER JT, MONNET DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012 Mar;18(3):268-81.

MARINHO, B.V.S.; ARAÚJO, A.C.S. Uso dos enxaguatórios bucais sobre a gengivite e biofilme dental. **International Journal of Dentistry.** v. 6, n. 4, p. 124-131. Recife, 2007.

MEDEIROS, E.A.S.; MENEZES, F.G.; VALLE, L.M.C. Pneumonias bacterianas associadas à saúde. **Associação Paulista de Estudos e Controle de Infecção Hospitalar – APECIH. Manual de prevenção de infecções hospitalares do trato respiratório.** 2a. ed. rev ampl. p.1-17. São Paulo, 2005.

MUNRO, C.L.; GRAP, M.J. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. **Am J Crit Care.** v.13, n.1, p.25-33, 2004.

NERANDZIC MM, DONSKEY CJ. Induced sporicidal activity of chlorhexidine against *Clostridium difficile* spores under altered physical and chemical conditions. **PLoS One.** 2015 Apr 10;10(4):e0123809.

NOBBS AH, LAMONT RJ, JENKINSON HF. Streptococcus adherence and colonization. **Microbiol Mol Biol Rev.** 2009 Sep;73(3):407-50,

ÖZÇAKA, Ö.; BAŞOĞLU, Ö. K.; BUDUNELI, N.; TAŞBAKAN, M.S.; BACAĞOĞLU, F.; KINANE, D.F . Chlorhexidine decreases the risk of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients: a randomized clinical trial. **J. Periodont. Res.** v.47, p.584-592, 2012.

PINTO, T.J.A.; KANEKO, T.M.; OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos.** 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 325, 2003.

PRAG G, FALK-BRYNHILDSEN K, JACOBSSON S, HELLMARK B, UNEMO M, SÖDERQUIST B. Decreased susceptibility to chlorhexidine and prevalence of disinfectant resistance genes among clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. **APMIS.** 2014 Oct;122(10):961-7.

PRATTEN, J.; BARNETT, P.; WILSON, M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. **Appl Environ Microbiol.** v.64, n.9, p.3515-9, 1998

ROCK, C.; THOM, K, A.; MASNICK, M.; JOHNSON, J, K.; HARRIS, A, D.; MORGAN, D, J. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v.35, n.4, p.426-429, Abr. 2014

RÖLLA, G.; MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. **J Dent Res.** v.54, p.62, 1975.

RUSHTON, A. SAFETY OF HIBITANE. II. Human experience. **J Clin Periodontol.** v.4, n.5, p.73-79, 1977.

SAFDAR, N.; CRNICH, C.J.; MAKI, D.G. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. **Respir Care.** v.50, n.6, p.725-39, p 739-41, 2005.

SALIM, N.; MOORE, C.; SILIKAS, N.; SATTERTHWAITTE, J.; RAUTEMAA, R. Chlorhexidine is a highly effective topical broad-spectrum agent against *Candida* spp. **Int. J. Antimicrobial. Agents,** v.41, p. 65-69, 2013.

SATO, L. Y. M. Higiene bucal com clorexidina na prevenção da pneumonia associada à ventilação mecânica. **Manaus,** 2009.

SCANNAPIECO FA, STEWART EM, MYLOTTE JM. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. **Crit Care Med** 1992;20:740-5.

SEMENOFF, T. A . Efetividade da clorexidina a 0,12% e a 2% armazenadas em diferentes temperaturas sobre alguns microrganismos - estudo in vitro. **Revista Periodontia**, v. 18, n. 2, p. 49 – 55, 2008.

SILVA, A . S . Controle mecânico do biofilme dental. **Revista Gestão & Saúde**, Curitiba, v. 2 , n. 2, p. 1 - 6 . 2011

SILVA, R. S.; SILVESTRE, M. O.; ZOCHE, T. L.; SAKAE, T. M. Pneumonia associada à ventilação mecânica: fatores de risco. **Rev Bras Clin Med**. v.9, n.1, p 1-10. São Paulo, 2011.

SILVESTRINI, T. L.; CRUZ, C. E. R. N. Pneumonia associada à ventilação mecânica em centro de terapia intensivo. **Revista brasileira de terapia intensiva**. v.16, n.4, p. 222-233, 2004.

SMITH, K.; ROBERTSON, D. P; LAPPIN, D.F; RAMAGE, G. Commercial mouthwashes are ineffective against oral MRSA biofilms. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol**. v. 115, p 624-629, 2013.

SOCRANSKY SS, HAFFAJEE AD. Periodontal microbial ecology. **Periodontol 2000**. 2005;38:135-87.

Sole ML, Poalillo FE, Byers JF, Ludy JE. Bacterial growth in secretions and on suctioning equipment of orally intubated patients: a pilot study. **Am J Crit Care** 2002;11:141-9.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J,W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Rev Microbiol.**, v.56, p.187-209, 2002

TABLAN, O.C, ANDERSON, L.J.; BESSER, R.; BRIDGES, C.; HAJJEH, R. CDC; Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. **Guidelines for the prevention of health-care— associated pneumonia: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee**. **MMWR Recomm Rep**. v.53, p. 1-36, 2004.

TORRES A, EL EBIARY M, GONZALEZ J, . Gastric and pharyngeal flora in nosocomial pneumonia acquired during mechanical ventilation. **Am Rev Respir Dis** 1993;148:352-7.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C. L. Controle do crescimento microbiano. **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. p.181-206, 2000.

VALENTI WM, TRUDELL RG, BENTLEY DW. Factors predisposing to oropharyngeal colonization with gram-negative bacilli in the aged. **N Engl J Med** 1978;298:1108-11.

VAN 'T HOF, W.; VEERMAN, E.C.; NIEUW AMERONGEN, A.V.; LIGTENBERG, A.J. Antimicrobial defense systems in saliva. **Monogr Oral Sci**. 2014;24:40-51.

WILLING BP, RUSSELL SL, FINLAY BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. **Nat Rev Microbiol**. 2011 Apr;9(4):233-43.

WINROW, M.J. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. **J Periodontal Res Suppl**. v.12, p.45-8, 1973.

YAMAGUCHI, M.; NOIRI, Y.; KUBONIWA, M.; YAMAMOTO, R.; ASAHI, Y.; MAEZONO, H . *Porphyromonas gingivitis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. **Eur. J. Oral Sci**. v.121, p. 162-168, 2013.

ZIJNGE V, VAN LEEUWEN MB, DEGENER JE, ABBAS F, THURNHEER T, GMÜR R, HARMSSEN HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. **PLoS One**. 2010 Feb 24;5(2):e9321.

9 ANEXOS

9.1 ANEXO A

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

SOCIEDADE EVANGÉLICA
BENEFICENTE DE CURITIBA -
PR



29/09/14

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Eigi Ricardo Sumi
Sarlo de Almeida.

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS DO TRATO RESPIRATÓRIO APÓS O USO DE CLOREXIDINA ORAL EM PACIENTE SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA

Pesquisador: FELIPE FRANCISCO BONDAN TUON

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 31506514.0.0000.0103

Instituição Proponente: Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 672.696

Data da Relatoria: 03/06/2014

Apresentação do Projeto:

Pacientes sujeitos às condições de ventilação mecânica nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) apresentam alto risco para desenvolvimento de pneumonia hospitalar. A pneumonia associada à ventilação mecânica aumenta a mortalidade e o tempo de permanência

hospitalar. **OBJETIVO:** o presente estudo procura avaliar a eficácia no uso da solução digluconato de clorexidina a 0,2% como auxiliar químico no controle do biofilme dental e de suas conseqüências nas mudanças da microbiota da cavidade oral e traqueal em pacientes internados em UTI.

MÉTODOS: Serão incluídos todos os adultos que forem internados na UTI, submetidos imediatamente à ventilação mecânica. Os pacientes eleitos

serão alocados ao acaso em dois grupos, A e B, inicialmente com cinco doentes cada. O grupo A será 'placebo', que é aquele que segue as

definições protocolares da UTI; o grupo B será 'experimental' que segue as mesmas rotinas do grupo A adicionando o uso de clorexidina. Serão

coletadas amostras no momento que o paciente é incluído no estudo. Novas coletas são realizadas após 3, 5, 7 e 10 dias. Serão coletas amostras

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770

Bairro: Bigorralho

CEP: 80.730-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3240-5570

Fax: (41)3240-5584

E-mail: comite.elica@fepar.edu.br

SOCIEDADE EVANGÉLICA
BENEFICENTE DE CURITIBA -
PR



Continuação do Parecer: 672.696

de placa dentária, swab oral e aspirado traqueal. Serão incluídos apenas os microrganismos que estejam relacionados com PAVM, excluindo-se culturas com flora mista, colonizadores de cavidade oral e anaeróbios. Os dados clínicos serão utilizados para avaliar semelhança entre os grupos A e B para avaliar possíveis interferências nos resultados de culturas e perfil de suscetibilidade. Os principais dados serão as espécies identificadas nos diferentes dias de coleta de cultura nos diferentes sítios. Da mesma forma serão comparados os perfis de suscetibilidade a clorexidina no grupo A e B.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo principal deste estudo é avaliar o perfil de suscetibilidade dos principais patógenos respiratórios associados com PAVM (pneumonia associada à ventilação mecânica) com e sem o uso de clorexidina oral e as concentrações mínimas inibitórias destas bactérias à clorexidina.

Objetivo Secundário:

1. Identificar o perfil das bactérias encontradas na cavidade bucal, placa dentária e aspirado traqueal com e sem o uso de digluconato de clorexidina, na concentração de 0,20%. 2. Avaliar o perfil de suscetibilidade das bactérias associadas com PAVM a clorexidina. 3. Comparar as espécies e perfil de suscetibilidade bacteriana de pacientes que fizeram uso de clorexidina oral para prevenção de PAVM com um grupo de pacientes que não fará a prevenção.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Nenhum risco para o paciente

Benefícios:

Nenhum benefício para o paciente. Os dados clínicos serão utilizados para avaliar semelhança entre os grupos A e B para avaliar possíveis interferências nos resultados de culturas e perfil de suscetibilidade.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Todos os exames laboratoriais serão solicitados pela equipe assistente e fazem parte da rotina,

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770

Bairro: Bigorriho

CEP: 80.730-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3240-5570

Fax: (41)3240-5584

E-mail: comite.etica@fepar.edu.br

SOCIEDADE EVANGÉLICA
BENEFICENTE DE CURITIBA -
PR



Continuação do Parecer: 672.696

não havendo interferência do pesquisador nesta rotina. Exame Inicial: dados pessoais do paciente; anamnese em geral e exame clínico constantes do prontuário médico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto de acordo com as legislações nacionais e internacionais de pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Evangélica Beneficente de Curitiba, de acordo com as atribuições definidas na Resolução 466/12 CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto conforme proposto para início da pesquisa.

Solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios semestrais sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

É dever do CEP acompanhar o desenvolvimento do projeto, por meio de relatórios semestrais dos pesquisadores e de outras estratégias de monitoramento, de acordo com o risco inerente à pesquisa

Endereço: Rua Padre Anchieta, 2770

Bairro: Bigorrião

CEP: 80.730-000

UF: PR

Município: CURITIBA

Telefone: (41)3240-5570

Fax: (41)3240-5584

E-mail: comite.etica@fepar.edu.br

9.2 ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DO PERFIL MICROBIOLÓGICO E DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS DO TRATO RESPIRATÓRIO APÓS O USO DE CLOREXIDINA ORAL EM PACIENTES SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA

InvestigadorES:
Felipe Francisco Tuon

Seção 1 Introdução

O senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de um estudo clínico. Antes de decidir participar, é importante que o senhor (a) entenda por que a pesquisa está sendo feita, o que envolverá e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos que pode causar. Leia com calma as informações abaixo e discuta sobre elas com o seu médico ou a equipe do estudo. Entendendo tudo sobre o estudo, caso o senhor (a) decida participar, então nós pediremos que assine este termo. Se o senhor (a) estiver participando de qualquer outro estudo clínico o senhor (a) não poderá participar deste estudo.

Estamos convidando o senhor (a) a participar de uma pesquisa que avaliará quais são as bactérias presentes nos dentes, na boca e nas vias respiratórias. Estas informações ajudarão a entender melhor como que as bactérias vão se modificando após o paciente entrar na UTI (unidade de terapia intensiva).

Nós acreditamos que, as bactérias que o paciente normalmente tem, vão sendo modificadas por bactérias hospitalares. A modificação pode ocorrer naturalmente ou após a limpeza com um produto que é utilizado frequentemente, que é chamada de clorexidina.

Leia todas estas informações cuidadosamente e, por favor, faça perguntas ao médico ou à equipe do estudo sobre suas dúvidas.

Seção 2 Objetivo da pesquisa

O objetivo desta pesquisa é estudar as bactérias que estão nas vias aéreas, boca e dentes em vários dias após entrar na UTI. Este estudo não vai testar remédios e nem aplicar medicamentos nos pacientes. Este estudo serve apenas para conhecer quais bactérias estão presentes nas vias respiratórias.

Seção 3 Descrição da Pesquisa e dos Procedimentos

No primeiro dia do estudo será colhida amostra de material da boca e dentes. Outras coletas destes mesmos locais vão ser realizadas nos dias 3, 5, 7 e 10 dias de internação.

Em algumas UTIs a limpeza da boca é feita com um produto chamado de clorexidina. A utilização desta substância não é obrigatória. Desta forma, neste estudo, metade dos pacientes vai usar esta substância, que já é usada várias vezes na UTI e a outra metade não vai receber este produto.

A coleta do material é feita com um cotonete na boca e um raspado no dente (igual ao dentista). Após isso nada mais é feito ao paciente e as bactérias serão identificadas no laboratório especialidade.

Seção 4 Riscos e Inconvenientes

Este estudo tem poucos riscos, pois passar o cotonete e remover uma pequena placa dentária não tem complicações. A substância clorexidina não é absorvida pelo corpo e só atua na região oral eliminando algumas bactérias que estão na boca.

Seção 5 Possíveis Benefícios a se obter com a Participação

O doente não vai ter nenhum benefício direto, pois só serve para conhecer as bactérias que estão nas vias aéreas. Por outro lado, o conhecimento sobre essas bactérias poderá melhorar a forma de tratamento e prevenção de infecções em outros pacientes no futuro.

Seção 6 Pagamento por participação no estudo

O senhor (a) não receberá qualquer compensação financeira por sua participação neste estudo porque esta prática é proibida em nosso país

Seção 7 A sua participação é voluntária

A sua participação neste estudo é voluntária. O senhor (a) poderá se recusar a participar ou sair do estudo a qualquer momento sem sofrer qualquer penalidade ou perda de benefícios aos quais tenha direito. O senhor (a) não tem qualquer obrigação de participar de um projeto de pesquisa proposto por seu médico.

Seção 8 Confidenciabilidade

Todos os dados do estudo são confidenciais; no entanto, os médicos pesquisadores autorizados, seus representantes, agências governamentais e o Comitê de Ética em Pesquisa poderão ter acesso aos dados. Os dados e resultados deste estudo também poderão ser apresentados em Congressos ou publicações, mas nestes casos, os participantes não serão identificados pelo nome.

Seção 9 A quem fazer perguntas

O senhor (a) tem o direito de fazer perguntas sobre este estudo a qualquer momento, e o senhor (a) é encorajado a fazê-lo. Se o senhor (a) tiver quaisquer perguntas acerca deste estudo, sobre os seus direitos ou se o senhor (a) sofrer quaisquer danos, entre em contato com o médico do estudo ou a equipe de pesquisa:

Nome: FELIPE FRANCISCO TUON Tel: 88521893

Seção 10 Direito de interromper a participação e procedimentos de Saída

O senhor (a) decide se quer ou não participar do estudo. Se decidir participar, terá a liberdade de sair do estudo a qualquer momento sem precisar explicar porque decidiu sair. Isso não afetará o padrão de tratamento que o senhor (a) recebe.

Seção 11 Assinaturas

Eu, (*nome do paciente em letra de forma*) _____, li e entendi todas as informações que me foram fornecidas neste termo de consentimento. Tive a oportunidade de discutir e tirar dúvidas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente. Concordo voluntariamente em participar do presente estudo. Entendo que receberei uma cópia assinada deste termo de consentimento.

Por meio da assinatura deste termo de consentimento, não renuncio a quaisquer direitos legais que eu teria como participante de uma pesquisa clínica.

Autorizo a divulgação de meus registros médicos ao patrocinador deste estudo (incluindo seus contratados e agentes), autoridades regulatórias e comitê de ética em pesquisa.

Assinatura do paciente

Data

Nome do paciente

Declaro que a informação sobre a natureza e propósito do presente estudo foi comunicada ao paciente acima nomeado.

Assinatura de quem aplicou o termo

Data

Nome de quem aplicou o termo

**ESTA SEÇÃO É APLICÁVEL A PACIENTES INCAPAZES DE LER OU QUE NECESSITEM DE TESTEMUNHAS PARA A
OBTENÇÃO DESTE TERMO**

Expliquei o conteúdo deste documento à pessoa acima que mostrou entender e dar seu consentimento de livre e espontânea vontade.

Assinatura da Testemunha 1 (se aplicável)

Data

Nome da Testemunha 1 (letras de forma)

Assinatura da Testemunha 2 (se aplicável)

Data

Nome da Testemunha 2 (letras de forma)

**ESTA SEÇÃO É APLICÁVEL A PACIENTES QUE ESTEJAM INCAPAZES DE ASSINAR ESTE TERMO DE
CONSENTIMENTO.**

Assinatura do responsável legal (se aplicável)

Data

Nome do responsável legal (letra de forma)

Data

9.3 ANEXO C

ARTIGO ENCAMINHADO PARA PUBLICAÇÃO

Já encaminhado para AMERICAN JOURNAL OF INFECTION CONTROL

Title:

Early modification of oral microbiota following admission to intensive care unit and oral hygiene with chlorhexidine – a prospective, randomized, controlled study

Running Title:

Chlorhexidine and MIC

Authors:

Felipe Francisco Tuon (1, 2); Oleg Gavrillo (1); Saulo de Almeida (3); Eigi Ricardo Sumi(3);

Thiago Alberto (3); Jaime Luis Rocha (1), Edvaldo Antonio Rosa (1)

1 School of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brazil;

2 Division of Infectious Diseases, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil;

3 Division of Infectious and Parasitic Diseases, Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, Curitiba, Brazil

Running title: chlorhexidine and infection

Keywords: chlorhexidine; microbiota; oral hygiene; intensive care unit; mechanical ventilation; infection

***Corresponding author:**

Felipe F. Tuon

Division of Infectious and Parasitic Diseases,

Hospital Universitário Evangélico de Curitiba

Alameda Augusto Stelfeld 1908, 3º. andar – SCIH - Bigorriho,

Zip Code 80730-150, Curitiba, Brazil

Email: flptuon@gmail.com

Telephone: 55-41-32405055

Fax: 55-41-32405274

Abstract

Background: Chlorhexidine (CHX) has been the most common product used for oral hygiene in patients under mechanical ventilation for prevention of ventilator-associated pneumonia (VAP). The change in dental plaque microbiota following CHX use in patients under mechanical ventilation has not been described. **Objective:** The aim of this study is to evaluate the presence of pathogenic bacteria associated with VAP in oral cavity and dental

plaque in patients using chlorhexidine. **Methods:** A prospective, randomized, controlled, double-blind study at a 600-bed university hospital from June 2014 to March 2015. Patients immediately submitted to mechanical ventilation were randomized for oral hygiene with CHX or placebo. Microbiology samples were collected from oral mucosa (OM) and dental plaque (DP) after admission and then on days 3, 5, 7 and 10. Determination of chlorhexidine minimal inhibitory concentration and minimal bactericidal concentration were performed. **Results:** 16 patients were included. In day 5, all patients had positive cultures for OM and DP. Upon admission, 6 patients had MDR bacteria, including a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Staphylococcus aureus* was the most common microorganism. The CHX group had a lower percentage of MRSA than placebo group in OM [RR=0.51 (0.27-0.98), p=0.011]. There was a high concordance of cultures between OM and DP (kappa index=0.825). VAP occurred in 6 patients and the species identified in tracheal aspiration of VAP patients were similar to those found in the OM in 4 cases. All strains showed low MIC and MBC for CHX (<0.039 mg/mL). **Conclusion:** Dental plaque is rapidly colonized with multidrug-resistant bacteria and that 2% chlorhexidine reduced colonization by *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCTION

Ventilator-associated pneumonia (VAP) is the most important infection in patients admitted to intensive care unit (ICU) (1). VAP is associated to prolonged hospitalization, increased costs, morbidity and mortality. The mechanism of pathogens entry in the lower respiratory tract of patients under mechanical ventilation is the aspiration of secretions from oropharynx and nasopharynx that accumulates over the orotracheal tube balloon (2).

The oral microbiota of patients in the ICU is different from healthy individuals. After 48 hours of hospital stay, the normal predominant Gram-positive microbiota changes to Gram-negative bacilli, usually the same species associated with VAP (3). Furthermore, those bacteria can use the normal dental plaque as a natural reservoir (4).

Several studies have shown that oral hygiene of patients under mechanical ventilation can reduce VAP rates (5). Chlorhexidine has been the most common product used once previous studies have shown the efficacy in reduce VAP rates (6). However, the change in dental plaque microbiota following chlorhexidine use in patients under mechanical ventilation has not been described. The aim of this study is to evaluate the presence of pathogenic bacteria associated with VAP in oral cavity and dental plaque in patients using chlorhexidine or placebo during admission to the ICU. The secondary objective is to evaluate minimal inhibitory and bactericidal concentrations of chlorhexidine among the identified bacteria.

METHODS

9.4 Study design

This is a prospective, randomized, controlled, double-blind study. The study was carried out at a 600-bed university hospital in Curitiba (Brazil) from June 2014 to March 2015. The study

was approved by the Ethics Committee (CAAE: 31506514.0.0000.0103). Clinical data, microbiological samples and progression to VAP were evaluated.

Inclusion and exclusion criteria

All of the following criteria should be met: patients admitted to the hospital and immediately submitted to mechanical ventilation; 18 years old or older; high probability of mechanical ventilation > 48h; permanent teeth (anterior and posterior). Exclusion criteria: impossibility to obtain the consent form; hospitalization > 24 hours; recent use of antibiotics (< 1 week) or admission to another hospital or emergency room; suspected infection in the upper or lower respiratory tract; less than 4 culture samples as described below.

Clinical data

Clinical data were evaluated, including age, gender, antibiotic use during the study, comorbidities and Charlson Comorbidity Index, progression to VAP during the study and until 7 days after last culture. VAP criteria were those defined by CDC (7).

9.5

9.6 Intervention

Patients included in the study were randomized for chlorhexidine (CHX) oral washing or placebo. In the chlorhexidine group, patients were submitted to oral wash with 15 mL of 2% CHX digluconate by a trained nursery team. The CHX solution was gently brushed in the gum, oral mucosa and tongue two times a day until ICU discharge. In the placebo group, oral wash was performed with a 0.9% NaCl solution.

Microbiology samples

Samples were collected from oral mucosa (OM) and dental plaque (DP) by curettage with a brush. The first sample was collected immediately after admission to the ICU and then on days 3, 5, 7 and 10. Samples were collected 6 hours after oral hygiene and were immediately plated for bacterial identification. The samples were inoculated on McConkey and Blood agar and only pathogenic bacteria were included for identification. Further identification and susceptibility tests were performed using automated method Vitek 2[®] (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) or disk diffusion according with bacterium using CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) as reference (8). The resistance rating (multidrug resistance, extended-resistance and pan-resistance) was done according to Magiorakos et al. (9). Carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* were tested for carbapenemase production with Hodge test and if positive, molecular test for *bla*_{KPC} detection as previous described (10).

Determination of Chlorhexidine Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration

A concentrated solution of 50 mg.mL⁻¹ (5% m.v⁻¹) chlorhexidine digluconate (CHX; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) was prepared with ultrapure water. This solution was diluted to obtain volumes of 100 mL at 2.5 mg.mL⁻¹ (0.25%), 1.25 mg.mL⁻¹ (0.12%); 0.65 mg.mL⁻¹ (0.065%); 0.31 mg.mL⁻¹ (0.031%); 0.15 mg.mL⁻¹ (0.015%); 0.078 mg.mL⁻¹ (0.0078%); and 0.039 mg.mL⁻¹ (0.0039%).

Bacteria were aerobically grown in Mueller-Hinton Agar dishes (Himedia Laboratories, Mumbai, India) at 37 °C for 24h. Characteristic colonies were obtained and suspended in sterile 145 mM NaCl solution until obtaining turbidity equivalent to ca. 0.5 in McFarland scale (ca. 1.5×10⁸ CFU.mL⁻¹). Bacterial suspensions were diluted at a ratio of 1:20 in sterile 145 mM NaCl solution.

Fifty-microliter aliquots of each bacterial suspension were transferred to 1.5-mL microtubes (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) and centrifuged at $10,000 \times g$ for 5 min at room temperature. Supernatants were discharged by tube inversion and 500 μL aliquots of different CHX solutions were added to each tube. Pellets were suspended by vortexing for 10 sec. Final suspensions were incubated at 37°C . After 1h (T1h) and 12h (T12h), microtubes were centrifuged ($10,000 \times g$, 5 min) and pellets were washed with 145 mM NaCl. This procedure was repeated more two times for CHX removal. After the last centrifugation, pellets were suspended with 300 μL of Mueller-Hinton Broth (Himedia Laboratories, Mumbai, India). Volumes were transferred to 96-well “U” bottom microtitration plates (K30-5096U; Kasvi Prod Equip Lab, Curitiba, Brazil) and aerobically incubated at 37°C , for 24-48h.

The absence of bacterial sediments was indicative of inhibitory effect and the lowest concentration achieving such effect was considered as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC_{CHX}). Suspensions were revolved and 10 μL aliquots were plated onto Muller-Hinton Agar surfaces. Dishes were properly incubated for 48h. The absence of bacterial growth was indicative of bactericidal effect and the lowest concentration achieving such effect was considered as the Minimum Bactericidal Concentration (MBC_{CHX}). All procedures were performed in triplicate, in three independent moments. Challenges with negative controls (145 mM NaCl) were conducted in parallel.

Statistical analysis

Clinical data were used to evaluate the similarity between chlorhexidine and placebo. Statistical tests were performed according to the variable. All statistical analyses were carried out using SPSS 18.0. Bivariate analysis was performed separately for each variable. P values

were calculated using the χ^2 test or Fisher's exact test for categorical variables and Student's t-test or Wilcoxon rank-sum test for continuous variables. The agreement of culture results between OM and DP was analyzed using kappa index. All tests were two-sided, and a P value ≤ 0.05 was considered significant.

RESULTS

Twenty-eight patients were screened, but 12 did not fulfill the inclusion criteria. A total of 16 patients were evaluated, 8 in the placebo group and 8 in the chlorhexidine group. Clinical data of 16 patients are detailed in Table 1. The mean age was 47.9 years (42.7 years-old in the placebo group and 53.1 years in the chlorhexidine group; $P = 0.229$). There were 5 men in the chlorhexidine group (62.5%) and 4 men in the control group (50.0%) ($P = 1$). The Charlson comorbidity score was similar in both groups.

The first culture was negative for pathogenic bacteria in 4 and 3 patients from OM and DP, respectively. In day 5, all patients had positive cultures for OM and DP. All bacteria identified in the OM and DP are described in Table 1 and figure 1. Upon admission, 6 patients had MDR bacteria, including a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. The resistance gene was identified as *bla*_{KPC-2}.

Staphylococcus aureus was the most common microorganism, followed by *Acinetobacter baumannii*. Both bacteria were commonly MDR (MRSA and carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*) (Table 2). The prevalence of MDR bacteria was similar between OM and DP.

The CHX group had a lower percentage of MRSA than placebo group in OM [RR=0.51 (0.27-0.98), p=0.011] and DP [RR=0.47 (0.23-0.92), p=0.006]. This difference was not seen for other bacteria. There was a high concordance of cultures between OM and DP with a kappa index of 0.825. Overtime, there was a tendency of same species of bacteria in sequential samples. In 10 patients, the first bacteria identified continue to be identified until the last sample. Antibiotic was not used in three patients, most of bacteria identified were not multidrug-resistant.

VAP occurred in four patients in the CHX group and in 2 patients in the placebo group. Out of the 6 VAP cases, five patients had positive cultures (quantitative) obtained from tracheal aspiration. The species identified in tracheal aspiration of VAP patients were similar to those found in the OM and DP in 4 cases. Molecular tests were not performed to evaluate clonality. All strains showed low MIC_{CHX} and MBC_{CHX} of 0.039 mg.mL⁻¹ (0.0039%) in T_{1h} and T_{12h}.

DISCUSSION

The microbiota of oral cavity can be modified by several factors, such as physical and chemical interactions with enzymes or microorganisms, reduction in saliva production and immunoglobulins, high levels of proteases and neuroaminidases associated with gingivitis and periodontal disease. All those conditions are associated with early colonization by Gram-negative bacilli (11). We found an early colonization of dental plaque and oral mucosa with Gram-negative bacilli, including multidrug-resistant species. We cannot state that there was a change in the microbiota because we evaluated only pathogenic bacteria and not normal microbiota. MRSA and even carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* were identified in the first sample.

The colonization can occur during the admission to the emergency room, but these patients can also be colonized during previous medical care (12, 13). The sources of multidrug-resistant bacteria are well known. In the hospital, the acquisition can occur during intubation or during aspiration of airways or oral cavity (14). We did not evaluate the clonality of these bacteria, which could be important to correlate with the species commonly found in the hospital. This could be also important to correlate species identified in DP and OM. In our city, the KPC-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* are polyclonal (10, 15), but not for *Enterococcus* spp. (16). We did not evaluate the recent history of hospitalization in other hospitals, as well as visits to emergency services that could justify an early positive culture.

In addition to early colonization, it became clear that colonization persisted throughout the study in most patients. Critically ill patients have increased protease levels, which remove a protective substance called fibronectin from the tooth surface. The fibronectin is a glycoprotein that inhibits the adherence of Gram-negative bacilli to the oropharynx. Some patients received antibiotic during admission to the ICU, but it cannot justify the early colonization.

In ICU patients, the microbial profile depends on the length of stay, use of antimicrobials, host susceptibility and ICU microbiota. Gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus* spp, *Acinetobacter* spp) and *Staphylococcus aureus* are often isolated in these patients (17). Patients in the ICU have an increased amount of dental biofilm, which is proportional to the length of stay. The longer the stay, the greater chance of biofilm colonization by multidrug-

resistant bacteria associated with respiratory infections. Our study showed a strong correlation of species identified in dental plaque scraped with the findings in the oral cavity.

Oral hygiene is an important factor in the prevention of ventilator-associated pneumonia (VAP). Mechanical hygiene methods have several limitations in the ICU, but antimicrobial agents in the form of mouthwashes are widely used in controlling plaque, helping the mechanical removal methods and reducing the number of pathogenic microorganisms in the oral cavity. The reduction in the total number of bacteria in the group receiving CHX was evident compared to the placebo group, and a significant reduction in MRSA was seen, confirming the *Staphylococcus* susceptibility profile already known to this antiseptic.

On the other hand, there was no change in the Gram-negative bacilli profile. Chlorhexidine showed to be active at low concentrations against a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria and fungi. These data were confirmed in our study when CHX MIC was determined, showing extremely low resistance levels for *S. aureus* and Gram-negative bacilli.

Exposure to CHX concentrations $\geq 0.039 \text{ mg.mL}^{-1}$ (0.0039%) was sufficient to inhibit the growth of 375,000 CFU bacteria and kill them both after exposure for one hour and 12 hours. This becomes interesting because the antimicrobial effect proved to be active at relatively low concentrations of CHX within reduced exposure time (1 hour). A recent study showed that low CHX concentrations [0.004 mg.mL^{-1} (0.0004% w/v)] may serve as an aid in the eradication of resistant bacterial forms such as *Clostridium difficile* spores (18).

It is important to remember that all *in vitro* tests analyzed the planktonic phenotype of bacteria, which are more sensitive to the antimicrobial action than those bacteria that grow in

biofilms. A dynamic biofilm model should be important to evaluate the MIC for CHX in biofilm bacteria (19). The ineffectiveness of chlorhexidine can be due to the fact that the bacterial vitality remains within the biofilm. Thus, it indicates the need of biofilm mechanical removal prior to the chlorhexidine use, e.g., using toothbrush.

The CDC (Center for Disease Control) suggests the implementation of an oral hygiene program and decontamination of the oral cavity with antiseptic in patients at an increased risk for nosocomial pneumonia (20). Although chlorhexidine reduces colonization in the oral cavity and, consequently, the prevalence of VAP and postoperative pneumonia, the reduction in mortality associated with these conditions has not yet been fully clarified (21).

We discussed some limitations in our study, but it is important to mention that we included a small number of patients that did not allow us to assess whether chlorhexidine changes the incidence of VAP. The non-quantitative bacterial identification of, not allowing to assess the number of colony-forming units has changed over time and between groups.

In summary, this study demonstrated that dental plaque is rapidly colonized with multidrug-resistant bacteria and that 2% chlorhexidine reduced colonization by *Staphylococcus aureus*.

ACKNOWLEDGEMENTS

None

LEGENDS

Table 1. Clinical characteristics and culture results for oral swab and dental smear of patients admitted to the ICU and on different days of mechanical ventilation. CRPA = Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; CSPA = Carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*; MSSA = Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; CESP = *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* or *Providencia*; CSAB = Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*; Kleb/prot = *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* or *Proteus* spp; CRAB = Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. CAZ = ceftazidime; VAN = vancomycin; CFZ = cefazolin; MEM = meropenem; CRO = ceftriaxone; AMK = amikacin; COL = colistin; CIP = ciprofloxacin; PIP = piperacillin/tazobactam. OM = oral mucosa; DP = Dental plate. Table 2. Comparison between patients submitted to oral hygienisation with chlorhexidine or placebo regarding the microbiological profile obtained by oral cavity swab or dental smear. MDR = multidrug-resistant bacteria; GPC = Gram-positive cocci; GNB = Gram-negative bacilli; MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CRAB = Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*

Figure 1. Species identified in culture from oral swab (Oral) and dental smear (Teeth). The horizontal axis shows the number of positive cultures during all time, and the vertical axis shows the identified bacteria. ESBL = Extended spectrum beta-lactamases bacteria; CRPA = Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; CSPA = Carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*; MSSA = Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; CESP = *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* or *Providencia*; CSAB = Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*; Kleb/prot = *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* or *Proteus* spp; CRAB = Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.

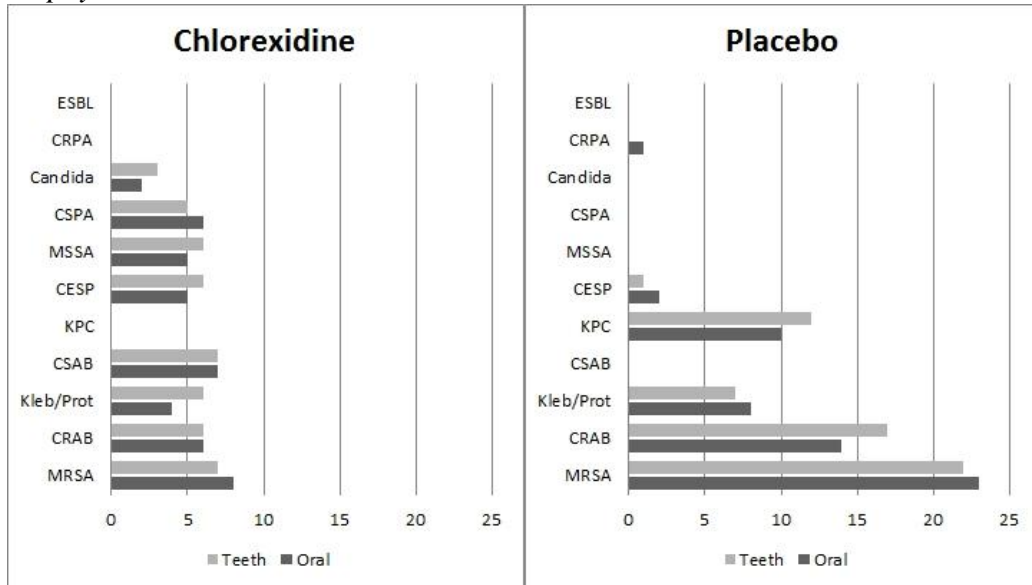
Table 1. Clinical characteristics and culture results for oral swab and dental smear of patients admitted to the ICU and on different days of mechanical ventilation. CRPA = Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; CSPA = Carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*; MSSA = Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; CESP = *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* or *Providencia*; CSAB = Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*; Kleb/prot = *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* or *Proteus* spp; CRAB = Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. CAZ = ceftazidime; VAN = vancomycin; CFZ = cefazolin; MEM = meropenem; CRO = ceftriaxone; AMK = amikacin; COL = colistin; CIP = ciprofloxacin; PIP = piperacillin/tazobactam. OM = oral mucosa; DP = Dental plate.

N	Chlorexidine	Gender	Age	Diseases	Charlson Index	Antibiotic*	Day 0		Day 3		Day 5		Day 7		Day 10		
							OM	DP	OM	DP	OM	DP	OM	DP	OM	DP	
1	No	Male	43	Burn	0	CAZ/VAN	MRSA	MRSA KPC	MRSA	MRSA	MRSA KPC	MRSA KPC	MRSA KPC	MRSA KPC	MRSA CRAB	MRSA CRAB	
3	No	Female	19	None	0	CFZ/MEM/VAN	CESP	-	CESP	CESP	MRSA CRAB KPC	MRSA CRAB KPC	MRSA CRAB KPC	MRSA KPC	MRSA KPC		
5	No	Male	31	None	0	CRO/AMK	KPC	KPC	KPC	KPC	KPC CRAB	KPC	KPC CRPA	KPC	KPC	KPC	
7	No	Male	56	Stroke	2	MEM/VAN/COL	MRSA CRAB	CRAB	CRAB	CRAB	CRAB	CRAB	KPC	KPC CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	
10	No	Female	19	None	0	CFZ/MEM/VAN	MRSA	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB Prot	MRSA CRAB Prot	MRSA CRAB Prot	MRSA CRAB Prot	NR	NR	
11	No	Female	83	Diabetes	1	CIP	-	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA Prot	MRSA Prot	Prot	Prot	
12	No	Male	50	None	0	MEM/VAN	Kleb	CRAB	CRAB	CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	
14	No	Female	41	Solid neoplasm	2	None	MRSA Kleb	MRSA	Kleb	MRSA Kleb	MRSA	Kleb	MRSA Kleb	Kleb	NR	NR	
2	Yes	Male	65	Cirrhosis	1	None	MRSA	-	-	Cand	MSSA	MSSA	-	MSSA	MSSA	MSSA	
4	Yes	Male	65	None	0	PIP/CAZ/MEM/VAN	-	Kleb	MRSA	MRSA	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	MRSA	MRSA	
6	Yes	Female	60	Stroke, hypertension	3	CRO	CESP Kleb	CESP	MSSA	CESP	CESP	CESP	CESP	CESP	CESP	-	-
8	Yes	Male	51	Solid neoplasm	2	CRO/VAN	CSAB	CSAB	CSAB	CSAB	CSAB MRSA	CSAB MRSA	CSAB	CSAB Kleb	CSAB MRSA	Kleb	
9	Yes	Male	37	Burn	1	VAN/MEM/COL	CSPA	CSPA	CSPA CRAB	CSPA CRAB	CRAB	Steno	CRAB	CRAB	MRSA CRAB	MRSA CRAB	
13	Yes	Female	46	None	0	CRO/MEM/VAN	-	-	-	-	Cand	Cand	Cand	Cand	CSAB CESP	CSAB CESP	
15	Yes	Female	55	Hypertension	0	CRO	Kleb	Kleb	MSSA Kleb	MSSA Kleb	-	MSSA Kleb	MSSA	MSSA	Kleb	MSSA	
16	Yes	Male	46	Renal failure	2	None	-	CSAB	CSAB CSPA	CSAB	CESP CSPA	CSPA	CSAP	CSPA CESP	CSPA	CSPA	

Table 2. Comparison between patients submitted to oral hygienisation with chlorhexidine or placebo regarding the microbiological profile obtained by oral cavity swab or dental smear. The “n” is the total number of samples during all time of the study. MDR = multidrug-resistant bacteria; GPC = Gram-positive cocci; GNB = Gram-negative bacilli; MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; CRAB = Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.

		Placebo		Chlorexidine		RR	95%CI	P
		(n=117)	%	(n=89)	%			
MDR	Total	99/117	86%	57/89	68%	0.81	(0.67-0.98)	0.003
	Oral	48/58	83%	27/43	63%	0.75	(0.58-0.98)	0.011
	Teeth	51/59	86%	30/46	65%	0.75	(0.59-0.95)	0.010
GPC	Total	45/117	38%	26/89	29%	0.75	(0.51-1.12)	0.083
	Oral	23/58	40%	13/43	30%	0.76	(0.43-1.32)	0.164
	Teeth	22/59	37%	13/46	28%	0.75	(0.42-1.33)	0.165
GNB	Total	72/117	62%	58/89	65%	1.85	(0.85-2.30)	0.296
	Oral	35/58	60%	28/43	65%	1.07	(0.79-1.46)	0.312
	Teeth	37/59	63%	30/46	65%	1.04	(0.77-1.38)	0.395
MRSA	Oral	23/58	40%	8/43	17%	0.51	(0.27-0.98)	0.011
	Teeth	22/59	37%	7/46	15%	0.47	(0.23-0.92)	0.006
CRAB	Oral	14/58	24%	6/43	14%	0.57	(0.24-1.38)	0.102
	Teeth	17/59	29%	6/43	14%	0.48	(0.20-1.12)	0.062

Figure 1. Species identified in culture from oral swab (Oral) and dental smear (Teeth). The horizontal axis shows the number of positive cultures during all time, and the vertical axis shows the identified bacteria. ESBL = Extended spectrum beta-lactamases bacteria; CRPA = Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; CSPA = Carbapenem-susceptible *Pseudomonas aeruginosa*; MSSA = Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*; CESP = *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* or *Providencia*; CSAB = Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*; Kleb/prot = *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* or *Proteus* spp; CRAB = Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*; MRSA = Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*.



References

1. Hutchins K, Karras G, Erwin J, Sullivan KL. Ventilator-associated pneumonia and oral care: a successful quality improvement project. *Am J Infect Control*. 2009;37(7):590-7.
2. Lorente L, Lecuona M, Jimenez A, Palmero S, Pastor E, Lafuente N, et al. Ventilator-associated pneumonia with or without toothbrushing: a randomized controlled trial. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(10):2621-9.
3. Munro CL, Grap MJ. Oral health and care in the intensive care unit: state of the science. *Am J Crit Care*. 2004;13(1):25-33; discussion 4.
4. Amaral SM, Cortes Ade Q, Pires FR. Nosocomial pneumonia: importance of the oral environment. *J Bras Pneumol*. 2009;35(11):1116-24.
5. Beraldo CC, Andrade D. Oral hygiene with chlorhexidine in preventing pneumonia associated with mechanical ventilation. *J Bras Pneumol*. 2008;34(9):707-14.
6. Klompas M, Speck K, Howell MD, Greene LR, Berenholtz SM. Reappraisal of routine oral care with chlorhexidine gluconate for patients receiving mechanical ventilation: systematic review and meta-analysis. *JAMA Intern Med*. 2014;174(5):751-61.
7. Emori TG, Culver DH, Horan TC, Jarvis WR, White JW, Olson DR, et al. National nosocomial infections surveillance system (NNIS): description of surveillance methods. *Am J Infect Control*. 1991;19(1):19-35.
8. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved Standard M100-S25. Clinical and Laboratory Standard Institute; 2015. 2015.
9. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *ClinMicrobiolInfect*. 2012;18(3):268-81.
10. Tuon FF, Rocha JL, Toledo P, Arend LN, Dias CH, Leite TM, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *BrazJInfectDis*. 2012;16(5):416-9.
11. Gibbons RJ. Bacterial adhesion to oral tissues: a model for infectious diseases. *J Dent Res*. 1989;68(5):750-60.

12. Abudu L, Blair I, Fraise A, Cheng KK. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a community-based prevalence survey. *Epidemiol Infect.* 2001;126(3):351-6.
13. Cheng Immergluck L, Kanungo S, Schwartz A, McIntyre A, Schreckenberger PC, Diaz PS. Prevalence of *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* nasopharyngeal colonization in healthy children in the United States. *Epidemiol Infect.* 2004;132(2):159-66.
14. Rock C, Thom KA, Masnick M, Johnson JK, Harris AD, Morgan DJ. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014;35(4):426-9.
15. Cieslinski JM, Arend L, Tuon FF, Silva EP, Ekermann RG, Dalla-Costa LM, et al. Molecular epidemiology characterization of OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from 8 Brazilian hospitals using repetitive sequence-based PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(4):337-40.
16. Tuon FF, Penteadó-Filho SR, Camilotti J, van der Heijden IM, Costa SF. Outbreak of vancomycin-resistant *Enterococcus* in a renal transplant unit. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(4):403-5.
17. Bassin AS, Niederman MS. New approaches to prevention and treatment of nosocomial pneumonia. *Semin Thorac Cardiovasc Surg.* 1995;7(2):70-7.
18. Nerandzic MM, Donskey CJ. Induced sporicidal activity of chlorhexidine against *Clostridium difficile* spores under altered physical and chemical conditions. *PLoS One.* 2015;10(4):e0123809.
19. Pratten J, Barnett P, Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms of oral bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998;64(9):3515-9.
20. Tablan OC, Anderson LJ, Besser R, Bridges C, Hajjeh R, Cdc, et al. Guidelines for preventing health-care--associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. *MMWR Recomm Rep.* 2004;53(RR-3):1-36.
21. Chlebicki MP, Safdar N. Topical chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care Med.* 2007;35(2):595-602.