



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA



**ESTUDO SOBRE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE
BACTÉRIAS DO BIOFILME LINGUAL DE CRIANÇAS SOB
VENTILAÇÃO MECÂNICA INVASIVA**

**SÃO LUIS
2024**

TANIA MARA LOPES ORTIZ MONTEIRO

**ESTUDO SOBRE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE BACTÉRIAS DO
BIOFILME LINGUAL DE CRIANÇAS SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA
INVASIVA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Odontologia como requisito para a obtenção do título
de Doutor em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Ferreira Lopes

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Flávia Castello Branco Vidal

**SÃO LUIS
2024**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Monteiro, Tania Mara Lopes Ortiz.

Estudo sobre quantificação relativa de bactérias do biofilme
lingual de crianças sob Ventilação Mecânica Invasiva / Tania Mara
Lopes Ortiz Monteiro. - 2024.

116 p.

Orientador(a): Prof^a Dr^a Fernanda Ferreira Lopes.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Odontologia/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
2024.

1. Biofilme. 2. Higiene Bucal. 3. PCR em tempo real.
4. UTI Pediátrica. 5. Ventilação Mecânica. I. Lopes, Fernanda
Ferreira. II. Título.

TANIA MARA LOPES ORTIZ MONTEIRO

**ESTUDO SOBRE QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DE BACTÉRIAS DO
BIOFILME LINGUAL DE CRIANÇAS SOB VENTILAÇÃO MECÂNICA
INVASIVA**

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Doutorado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia / / , considerou a candidata.

() APROVADO

() REPROVADO

- 1) Examinador: Prof^ª Dr^ª Cecília Cláudia Costa Ribeiro
- 2) Examinador: Prof^ª Dr^ª Josélia Alencar Lima
- 3) Examinador: Prof^ª Dr^ª Simone Souza Lobão Veras Barros
- 4) Examinador: Dr^ª Anna Clara Fontes Vieira
- 5) Presidente (Orientador): Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Ferreira Lopes

“Assim diz o Senhor: Não se glorie o sábio na sua sabedoria, nem se glorie o forte na sua força; não se glorie o rico nas suas riquezas, mas o que se gloriar, glorie-se nisto: em me entender e me conhecer, que eu sou o Senhor, que faço beneficência, juízo e justiça na terra; porque destas coisas me agrado, diz o Senhor

Jeremias 9:23,24

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o Autor da Vida, Amigo Fiel, Pai Amado, Maravilhoso, Conselheiro, Pai da Eternidade, Príncipe da Paz. A **Deus**, toda glória.

Agradeço ao meu esposo Eneas Monteiro pelo companheirismo, amor, apoio, paciência, incentivo. Você é um presente de Deus na minha vida.

Agradeço aos meus filhos queridos Eneas William, Miguel Henrique e Pedro Felipe, meus tesouros, herança do Senhor. Obrigada pela compreensão, bom comportamento, apoio e incentivo. Amo vocês com todas as minhas forças.

Agradeço aos meus pais Nivaldo e Dalva Ortiz. Obrigada pelas palavras de segurança e força quando achei que seria uma jornada difícil. Mamãe querida, muito obrigada pelos “empurrões”, por sempre acreditar e dizer que daria certo. Amo vocês.

Agradeço à minha irmã Alessandra e meu sobrinho Artur pelas risadas e visitas. Amo vocês.

Agradeço de todo meu coração à professora Fernanda Lopes por ter sido compreensiva ao longo deste caminho. Obrigada pela sua calma, por seus conselhos, por seus ensinamentos. Obrigada pelo privilégio de tê-la como orientadora e por acreditar no meu potencial. Obrigada pela disponibilidade em me ajudar e corrigir quando necessário. Foram 4 anos de crescimento tendo a senhora como orientadora. Muito obrigada, muito obrigada mesmo. Peço a Deus que ilumine e guie seu caminho e de sua família com paz, amor, saúde e prosperidade.

Agradeço à professora Flávia Vidal pela tranquilidade, alegria e paciência. Obrigada pelos ensinamentos, por me ajudar a entender sobre PCR em tempo real de forma tão fácil. Obrigada porque desde a primeira vez que entrei no laboratório de Biologia fui muito bem recebida pela senhora. Obrigada pelas conversas no laboratório e risadas. Admiro a forma leve que a senhora vive a vida. Parabéns e obrigada. A senhora me inspira. Deus abençoe sua vida e de toda sua família.

Agradeço ao professor Vandilson pelo apoio e análise estatística dos artigos de forma especular. Obrigada pelo seu bom humor e tranquilidade. Você é maravilhoso. Deus te abençoe sempre.

Agradeço à colega Camila Simas e ao colega Fábio Mesquita pelo apoio na etapa da coleta das amostras. Vocês são maravilhosos. Deus abençoe.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) pela elevada qualidade do ensino oferecido e possibilidade de realização de pesquisas de alto impacto científico.

Agradeço ao Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão- Unidade Materno Infantil (HUUFMA/UMI) e à Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) por permitir o acesso à Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica para realização da coleta do biofilme lingual das crianças em Ventilação Mecânica Invasiva.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

Figura 1. Fluxograma das etapas iniciais (não laboratoriais) da pesquisa.....32

Figura 2. Associação da presença da *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual das crianças sob VMI nos dois tempos da coleta T1 (A, C) e T2 (B, D) com desfecho hospitalar (alta e óbito). Teste qui-quadrado ou exato de Fisher.....38

Figura 3. Análise comparativo da quantidade de patógenos *Pseudomonas aeruginosa* (A) e *Klebsiella pneumoniae* (B) entre os desfechos hospitalares alta e óbito. Teste Mann-Whitney.....39

Figura 4. Regressão logística multivariada da associação da presença dos patógenos ajustada para idade e tempo de sob VMI sobre a ocorrência de óbito na amostra avaliada.....40

ARTIGO 2

Figura 1. Fluxograma das etapas iniciais da pesquisa.....56

Figura 2. Comparação do biofilme lingual (em Ct) entre os tempos de coleta na amostra de criança sob VMI. T1 = no momento da intubação. T2 = 48 horas depois da primeira coleta.....61

Figura 3 - Média $2^{\Delta\Delta Ct}$ de bactérias totais do biofilme lingual de crianças em VMI, conforme o desfecho alta ou óbito.....62

Figura 4. Análise de correlação linear de Pearson entre ΔCt e tempo de hospitalização (a) e tempo em ventilação mecânica (b). IH = internação hospitalar. VMI = ventilação mecânica invasiva.....63

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Distribuição das variáveis de caracterização geral dos pacientes incluídos.....35

Tabela 2. Associação entre a presença dos patógenos nos tempos de estudo com a presença ou ausência de biofilme lingual.....36

ARTIGO 2

Tabela 1- Distribuição das variáveis sociodemográficos, tempo de hospitalização, tempo de ventilação mecânica, avaliação bucal e desfecho clínico na amostra de crianças sob VMI incluídas no estudo.....59

Tabela 2. Análise de regressão das medidas do biofilme em ΔC_t ajustados para idade da criança sobre dias de hospitalização e dias em VMI.....64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IH- Internação Hospitalar

VMI- Ventilação Mecânica Invasiva

PAV- Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica

UTI- Unidade de Terapia Intensiva

UITP- Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica

Ct- threshold cycle

Δ Ct- delta Ct

$\Delta\Delta$ Ct- delta delta Ct

PCR- Reação em Cadeia Polimerase

PHB- Protocolo de Higiene Bucal

AMIB- Associação de Medicina Intensiva Brasileira

DNA- Ácido Desoxirribonucleico

RESUMO

O biofilme lingual de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) sob ventilação mecânica invasiva (VMI), pode abrigar patógenos respiratórios, possibilitando a translocação bacteriana do meio bucal para os pulmões via tubo orotraqueal, causando infecções sistêmicas graves, como a Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV), repercutindo nos dias de hospitalização e dias em VMI. A colonização do biofilme lingual por patógenos ocorrem a partir de 48 horas após a intubação do paciente, podendo estar relacionada à higienização oral inadequada. Os microorganismos envolvidos incluem bactérias gram-negativas tais como: *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. A multiplicação desses patógenos ocorre devido a falha no sistema de defesa dos pacientes em VMI, de forma que pacientes infectados por esses patógenos multirresistentes tem os piores desfechos com maior mortalidade. Estudos tem mostrado que a execução de um Protocolo de Higiene Bucal é um instrumento eficaz na diminuição da quantificação relativa de bactérias do biofilme lingual de crianças intubadas em UTI e na redução significativa nos dias de uso da ventilação mecânica invasiva. A hipótese dessa Tese é que a multiplicação de bactérias totais no biofilme lingual de crianças sob ventilação mecânica invasiva e a frequência dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* nesse biofilme lingual, podem variar de acordo com desfechos hospitalares (alta e óbito), higiene bucal, presença de PAV, dias de hospitalização e dias sob VMI em UTI Pediátrica. O capítulo I desta tese foi o artigo original **“Quantificação relativa de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob ventilação mecânica invasiva e sua associação com desfecho hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva”** com objetivo de investigar associação entre a quantidade de patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob ventilação mecânica invasiva e desfecho hospitalar (alta e óbito) em UTI Pediátrica. Trata-se de um coorte conduzida com 24 pacientes em VMI, de ambos sexos, com idade de 1 a 144 meses. A coleta do biofilme lingual ocorreu: no momento da intubação (T1) e 48 horas depois da primeira coleta (T2). Foi realizada extração do DNA das amostras e, para detecção do DNA das bactérias específicas, utilizou-se um par de primer bacteriano para *Pseudomonas aeruginosa* e um par de primer bacteriano para *Klebsiella pneumoniae*. A qPCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em Tempo Real permitiu a quantificação relativa das bactérias detectadas e amplificadas em cada ciclo da reação. A curva Ct (threshold cycle) indica o número do ciclo fracionário em que a quantidade de alvo amplificado atinge um limiar fixo. Os níveis

de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico alvo na amostra (ou seja, quanto mais baixo o nível Ct, maior é a quantidade de ácido nucleico/mais bactérias). O Δ Ct (delta Ct) consiste na diferença de expressão entre o alvo e o controle da amostra (média de *Pseudomonas aeruginosas* ou *Klebsiella pneumoniae* – média do primer bacteriano universal 16S) sendo que o Δ Ct positivo indica menos bactérias e o Δ Ct negativo, maior quantidade de bactérias. Os resultados foram analisados com base no método de quantificação dos dados da qPCR, o $\Delta\Delta$ Ct (delta delta Ct), que é a diferença entre Δ CtT2 e Δ CtT1, resultando na variação quantitativa das bactérias de cada amostra. Observou-se que ao testar a associação entre a presença dos patógenos avaliados nos tempos de estudo com a presença ou ausência de sinal clínico de biofilme lingual, não se observou associações significantes. A associação da presença dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob VMI com desfecho hospitalar alta (15 pacientes) e óbito (9 pacientes) dentro dos tempos de estudo T1 e T2, revelou que em T2, o percentual de *Pseudomonas aeruginosa* presentes no biofilme lingual dos pacientes que foram a óbito foi estatisticamente mais elevado que nos pacientes que receberam alta hospitalar (90% versus 40%; P = 0,033). Ao analisar a quantidade dos patógenos no biofilme lingual das crianças sob VMI, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos alta e óbito, uma vez que não variou a quantidade de bactérias (*Pseudomonas aeruginosas* e *Klebsiella pneumoniae*) quanto ao desfecho hospitalar. A regressão logística multivariada da associação da presença dos patógenos no biofilme lingual de crianças intubadas, ajustada para idade e tempo sob VMI sobre a ocorrência de óbito, reforçou que a presença de *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme lingual em T2 foi associada com o desfecho óbito mesmo depois de ajustados para os demais fatores de confusão (OR ajustado = 39,2% ; IC95% = 1,07-1485; P = 0,048). **Conclusão:** A presença da *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme lingual de crianças sob VMI parece mais importante do que a sua quantidade para associação com óbito em UTI Pediátrica. **Implicações práticas:** Contribuições para cuidados de saúde, salientando a importância de estudos focados na presença bacteriana no biofilme lingual de crianças sob VMI em UTI Pediátrica para traçar estratégias de saúde pública visando seu controle. O capítulo II desta tese foi o artigo “**Quantificação relativa de bactérias totais no biofilme lingual de crianças intubadas em Unidade de Terapia Intensiva, higiene bucal, desfecho hospitalar, dias de hospitalização, dias sob ventilação mecânica invasiva e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica: existe associação?**” com objetivo de investigar se existe associação entre quantificação relativa de bactérias totais

do biofilme lingual de crianças intubadas em UTI, higiene bucal, desfecho hospitalar, dias de hospitalização, dias sob Ventilação Mecânica Invasiva e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica. Trata-se de uma coorte conduzida com 24 pacientes em VMI, ambos sexos e idade de 1 a 144 meses. A coleta do biofilme lingual ocorreu: no momento da intubação (T1) e 48 horas depois da primeira coleta (T2). Foi realizada extração do DNA das amostras e utilizado um par de primer bacteriano universal 16S para detecção do DNA das bactérias totais presentes nessa amostra. A qPCR (Reação da Cadeia de Polimerase) em Tempo Real permitiu a quantificação relativa das bactérias detectadas e amplificadas em cada ciclo da reação. A curva Ct (threshold cycle) indica o número do ciclo fracionário em que a quantidade de alvo amplificado atinge um limiar fixo. Os níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico alvo na amostra (ou seja, quanto mais baixo o nível Ct, maior é a quantidade de ácido nucleico/mais bactérias). O Δ Ct (delta Ct) consiste na diferença de expressão entre o alvo e o controle da amostra (Média CtT2 – Média CtT1) sendo que o Δ Ct positivo indica menos bactérias e o Δ Ct negativo, maior quantidade de bactérias. $\Delta\Delta$ Ct (delta delta Ct) é a diferença entre Δ CtT2 e Δ CtT1, resultando na variação quantitativa das bactérias de cada amostra. Os resultados foram analisados com base no método de quantificação dos dados da qPCR, o método Ct, sendo possível observar que no biofilme coletado, a média Ct para quantificação relativa de bactérias do biofilme lingual foi menor ($25,15 \pm 6,17$) em T1 (menor Ct=mais bactérias) enquanto que a média foi maior ($27,23 \pm 5,61$) em T2 (maior Ct=menos bactérias) (Teste t-pareado, $p = 0,0394$), revelando significativa diminuição na quantificação de patógenos do biofilme lingual após a execução do Protocolo de Higiene Bucal (PHB). A média da quantidade de bactérias totais no biofilme lingual da amostra total do estudo, foi dividida de acordo com o desfecho da internação hospitalar (alta e óbito), por meio da quantificação relativa através do método $\Delta\Delta$ Ct. Observou-se menor expressão relativa de bactérias totais nas crianças que tiveram alta (73.093) que aquelas que vieram a óbito (114.380), revelando tendência destas últimas apresentarem maior colonização de bactérias totais no biofilme lingual, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$, Teste de Mann-Whitney). Os resultados mostraram correlação negativa (inversa) entre Δ Ct e quantidade de dias de hospitalização ($r = -0,279$; $P = 0,185$), porém sem diferença estatística. Bem como diferença estatística na correlação negativa entre Δ Ct e quantidade de dias em VMI ($r = -0,422$ e $p = 0,040$), com magnitude moderada e coeficiente de determinação (r^2) de 0,178, revelando que a maior quantidade dos participante (Δ Ct positivo=menos bactérias) com maior controle do biofilme

lingual ficaram menos tempo em VMI, com variância compartilhada de 17,8%. A análise de regressão múltipla foi realizada para estimar o efeito do ΔCt , ajustada para idade, sobre dias de hospitalização e dias em VMI. Não houve diferença significativa entre ΔCt e dias de hospitalização e a análise ajustada para a idade mostrou medida estatística limítrofe (coeficiente = -0,41, P = 0,053) para a relação entre ΔCt e dias em VMI, indicando que não houve evidência suficientemente forte para provar a associação. **Conclusão:** A execução de um Protocolo de Higiene Bucal mostrou ser um instrumento eficaz na diminuição da quantificação de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas em Unidade de Terapia Intensiva, com menor quantificação relativa de bactérias totais no biofilme lingual das crianças que tiveram alta e tendência, das que foram a óbito, apresentarem maior colonização de bactérias totais neste biofilme. Os participantes com maior controle do biofilme lingual, (ΔCt positivo=menos bactérias), ficaram menos tempo em Ventilação Mecânica Invasiva. Desse modo, esses pacientes são mais beneficiados quando realizado o Protocolo de Higiene Bucal. Porém no presente estudo, não foi possível observar forte associação com dias de hospitalização. **Implicações práticas:** Contribuições para cuidados de saúde, salientando a importância do desenvolvimento e implementação de um PHB em uma UTI Pediátrica a fim de reduzir a quantificação relativa de bactérias do biofilme lingual de crianças intubadas e reduzir dias em ventilação mecânica invasiva.

Palavras chave: Biofilme, Ventilação Mecânica, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, UTI Pediátrica, PCR em tempo real, Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica, Higiene Bucal.

ABSTRACT

The lingual biofilm of patients admitted to the Intensive Care Unit (ICU) under invasive mechanical ventilation (IMV) can harbor respiratory pathogens, enabling bacterial translocation from the oral environment to the lungs via the orotracheal tube, causing serious systemic infections, such as Mechanical Ventilation-Associated Pneumonia (MVAP), with repercussions on hospitalization days and days on IMV. Colonization of the lingual biofilm by pathogens occurs 48 hours after the patient is intubated, and may be related to inadequate oral hygiene. The microorganisms involved include gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. The multiplication of these pathogens occurs due to the failure of the IMV patient's defense system, so that patients infected with these multidrug-resistant pathogens have the worst outcomes with the highest mortality. Studies have shown that the implementation of an Oral Hygiene Protocol is an effective tool in reducing the relative quantification of bacteria in the lingual biofilm of children intubated in the ICU and in significantly reducing the number of days of invasive mechanical ventilation. Thus, the hypothesis of this thesis is that the multiplication of total bacteria in the lingual biofilm of children under invasive mechanical ventilation and the frequency of the pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in this lingual biofilm may vary according to hospital outcomes, oral hygiene, the presence of VAP, days of hospitalization and days under IMV in a paediatric ICU. Chapter I of this thesis was the original article "**Relative quantification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in the lingual biofilm of children under invasive mechanical ventilation and its association with hospital outcome in an Intensive Care Unit**", which aimed to investigate the association between the quantity of pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in the lingual biofilm of children under invasive mechanical ventilation and hospital outcome (discharge and death) in a Pediatric ICU. This is a cohort study of 24 IMV patients of both sexes aged between 1 and 144 months. Tongue biofilm was collected at the time of intubation (T1) and 48 hours after the first collection (T2). DNA was extracted from the samples and a bacterial primer pair for *Pseudomonas aeruginosa* and a bacterial primer pair for *Klebsiella pneumoniae* were used to detect the DNA of the specific bacteria. Real-time qPCR (Polymerase Chain Reaction) allowed the relative quantification of the bacteria detected and amplified in each cycle of the reaction. The Ct (threshold cycle) curve indicates the fractional cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold. Ct levels are inversely proportional to the

amount of target nucleic acid in the sample (i.e. the lower the Ct level, the higher the amount of nucleic acid). The ΔCt (delta Ct) consists of the difference in expression between the target and control sample (average of *Pseudomonas aeruginosa* or *Klebsiella pneumoniae* - average of the 16S universal bacterial primer), with a positive ΔCt indicating fewer bacteria and a negative ΔCt indicating more bacteria. The results were analyzed using the qPCR data quantification method, $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct), which is the difference between $\Delta Ct T2$ and $\Delta Ct T1$, resulting in the quantitative variation of bacteria in each sample. When testing the association between the presence of the pathogens evaluated at the study times and the presence or absence of clinical signs of lingual biofilm, no significant associations were observed. The association between the presence of the pathogens *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in the lingual biofilm of children under IMV with hospital discharge (15 patients) and death (9 patients) within the T1 and T2 study times revealed that in T2, the percentage of *Pseudomonas aeruginosa* present in the lingual biofilm of patients who died was statistically higher than in patients who were discharged (90% versus 10%; $P = 0.033$). When analyzing the amount of pathogens in the lingual biofilm of children under IMV, no significant differences were identified between the discharge and death groups, since the amount of bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*) did not vary in relation to the hospital outcome. Multivariate logistic regression of the association between the presence of pathogens in the lingual biofilm of intubated children, adjusted for age and time under IMV and the occurrence of death, reinforced that the presence of *Pseudomonas aeruginosa* in the lingual biofilm at T2 was associated with the outcome of death even after adjusting for other confounding factors (adjusted OR = 39.2%; 95% CI = 1.07-1485; $P = 0.048$). **Conclusion:** The presence of *Pseudomonas aeruginosa* in the lingual biofilm of children under IMV seems to be more important than its quantity for the association with death in the pediatric ICU. **Practical implications:** Contributions to health care, highlighting the importance of studies focused on the bacterial presence in the lingual biofilm of children under IMV in Pediatric ICUs in order to draw up public health strategies aimed at its control. Chapter II of this thesis was the article "**Relative quantification of total bacteria in the lingual biofilm of children intubated in an Intensive Care Unit, oral hygiene, hospital outcome, days of hospitalization, days under invasive mechanical ventilation and Mechanical Ventilation-Associated Pneumonia: is there an association?**" with the aim of investigating whether there is an association between the relative quantification of total bacteria in the lingual biofilm of children intubated in the

ICU, oral hygiene, hospital outcome, days of hospitalization, days on Invasive Mechanical Ventilation and Mechanical Ventilation-Associated Pneumonia. This is a cohort study of 24 patients on IMV, both sexes and aged between 1 and 144 months. Tongue biofilm was collected at the time of intubation (T1) and 48 hours after the first collection (T2). DNA was extracted from the samples and a 16S universal bacterial primer pair was used to detect the DNA of the total bacteria present in the sample. Real-time qPCR (Polymerase Chain Reaction) allowed the relative quantification of the bacteria detected and amplified in each cycle of the reaction. The Ct (threshold cycle) curve indicates the fractional cycle number at which the amount of amplified target reaches a fixed threshold. Ct levels are inversely proportional to the amount of target nucleic acid in the sample (i.e. the lower the Ct level, the greater the amount of nucleic acid/more bacteria). The Δ Ct (delta Ct) consists of the difference in expression between the target and control sample (Mean CtT2 - Mean CtT1), with a positive Δ Ct indicating fewer bacteria and a negative Δ Ct indicating more bacteria. $\Delta\Delta$ Ct (delta delta Ct) is the difference between Δ CtT2 and Δ CtT1, resulting in the quantitative variation of bacteria in each sample. The results were analyzed using the qPCR data quantification method, the Ct method, and it can be seen that in the biofilm collected, the mean Ct for relative quantification of lingual biofilm bacteria was lower (25.15 ± 6.17) in T1 (lower Ct=more bacteria) while the mean was higher (27.23 ± 5.61) in T2 (higher Ct=less bacteria) (paired t-test, $p = 0.0394$), revealing a significant decrease in the quantification of pathogens in the lingual biofilm after the Oral Hygiene Protocol (OHP) was implemented. The average amount of total bacteria in the lingual biofilm of the total study sample was divided according to the outcome of hospitalization (discharge and death), using relative quantification using the $\Delta\Delta$ Ct method. There was a lower relative expression of total bacteria in the children who were discharged (73,093) than those who died (114,380), revealing a tendency for the latter to have greater colonization of total bacteria in the lingual biofilm, although there was no significant difference between the groups ($p > 0.05$, Mann-Whitney test). The results showed a negative (inverse) correlation between Δ Ct and the number of days of hospitalization ($r = -0.279$; $P = 0.185$), but no statistical difference. As well as a statistical difference in the negative correlation between Δ Ct and number of days in IMV ($r = -0.422$ and $p = 0.040$), with moderate magnitude and a coefficient of determination (r^2) of 0.178, revealing that the greater number of participants (Δ Ct positive=fewer bacteria) with greater control of the lingual biofilm spent less time in IMV, with a shared variance of 17.8%. Multiple regression analysis was performed to estimate the effect of Δ Ct, adjusted for

age, on days of hospitalization and days in IMV. There was no significant difference between ΔC_t and days of hospitalization and the analysis adjusted for age showed a borderline statistical measure (coefficient = -0.41, $P = 0.053$) for the relationship between ΔC_t and days in IMV, indicating that there was not enough strong evidence to prove the association. **Conclusion:** The implementation of an Oral Hygiene Protocol proved to be an effective tool in reducing the quantification of total bacteria in the lingual biofilm of children intubated in an Intensive Care Unit, with a lower relative quantification of total bacteria in the lingual biofilm of children who were discharged and a tendency for those who died to show greater colonization of total bacteria in this biofilm. Participants with greater control of lingual biofilm (ΔC_t positive=fewer bacteria) spent less time on Invasive Mechanical Ventilation. Thus, these patients benefit more when the Oral Hygiene Protocol is used. However, in this study, it was not possible to observe a strong association with days of hospitalization. **Practical implications:** Contributions to health care, highlighting the importance of developing and implementing a PHB in a Pediatric ICU in order to reduce the relative quantification of lingual biofilm bacteria of intubated children and reduce days on invasive mechanical ventilation.

Key words: Biofilm, Mechanical Ventilation, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, Pediatric ICU, Real-time PCR, Mechanical Ventilation-Associated Pneumonia, Oral Hygiene.

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	15
1 INTRODUÇÃO	18
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1 Bactérias do biofilme lingual de crianças intubadas, PAV, dias de hospitalização e dias em ventilação mecânica invasiva.....	20
2.2 Patógenos respiratórios.....	21
2.2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	22
2.3 Protocolo de Higiene Bucal em Unidade de Terapia Intensiva.....	23
3 CAPÍTULO 1.....	26
4 CAPÍTULO 2.....	50
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	75
REFERÊNCIAS	76
ANEXOS.....	84
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.....	85
ANEXO B – Diretrizes para publicação de trabalhos na Brazilian Oral Research (Artigo 1).....	91
ANEXO C - Diretrizes para publicação de trabalhos na Journal of Child Health Care. (Artigo 2).....	100

1. INTRODUÇÃO

Nos pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) sob ventilação mecânica invasiva (VMI), o biofilme do dorso da língua tem sido associado a infecções bacterianas, virais e/ou fúngicas, pois atua como um nicho considerável de patógenos respiratórios (Tulio *et al.*, 2018), possibilitando a translocação bacteriana do meio oral para os pulmões via tubo orotraqueal (Sands *et al.*, 2017), causando infecções sistêmicas graves como a Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) (Song *et al.*, 2023; Otsuji *et al.*, 2019), repercutindo significativamente nos dias de hospitalização e dias em VMI (Mota *et al.*, 2017; Anvisa 2017).

A VMI é um recurso de suporte ventilatório usado em pacientes críticos (Oliveira & Cardoso, 2023), sendo realizada através da intubação orotraqueal (Costa *et al.*, 2021). Crianças internadas em UTIP frequentemente necessitam desse suporte respiratório para o tratamento de desconforto e insuficiência respiratória. O objetivo da VMI não é normalizar as trocas gasosas, mas alcançar oxigenação e ventilação suficientes para garantir a viabilidade dos tecidos até a recuperação da função pulmonar aceitável, minimizando o trabalho respiratório excessivo e possíveis complicações. Quando usada com precisão, é uma intervenção que salva vidas, mas deve-se tomar cuidado para evitar lesões pulmonares induzidas pelo tubo (Alibrahim *et al.*, 2022).

Nesses pacientes em VMI a colonização da microbiota oral normalmente acontece a partir de 48 horas após a intubação (Zhao *et al.*, 2020) e podem estar relacionadas à higienização bucal inadequada (Simões *et al.*, 2020; Tulio *et al.*, 2018). Por outro lado, em pacientes submetidos à higiene bucal, é possível observar redução significativa no tempo de VMI e do tempo de internação na UTI (Lacerda Vidal *et al.*, 2017). Estudos tem mostrado a eficácia da higiene no controle do biofilme oral para mitigar a proliferação de bactérias prevenindo o desenvolvimento de infecção respiratória como a PAV em pacientes sob VMI em UTI Pediátrica (Ludovichetti, *et al.*, 2022; Cordeiro *et al.*, 2022).

Os principais patógenos envolvidos na colonização das vias aéreas logo após a intubação incluem bactérias gram-negativas tais como: *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Kohbodi *et al.*, 2022). Em uma grande revisão retrospectiva

realizada nas UTIs de três hospitais, a microbiologia foi a mesma em hospitais adultos e pediátricos. Os organismos mais comuns foram *Staphylococcus aureus* (28,4%), *Pseudomonas aeruginosa* (25,2%) e outros gram negativos (26,6%) (Jain *et al.*, 2023; Iosifidis *et al.*, 2018).

Esses microrganismos representam papel crítico nas infecções hospitalares devido à sua virulência e aquisição de resistência a diversos agentes antimicrobianos, inclusive aqueles utilizados como último recurso nas UTIs (Romandini *et al.*, 2021). A multiplicação desses patógenos infectantes ocorre devido a falha no sistema de defesa dos pacientes em VMI (Keane; Martin-Loeches, 2019) de forma que pacientes infectados por esses patógenos multirresistentes tem os piores desfechos com maior mortalidade (Oliveira *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2023; Carvalho *et al.*, 2021).

A hipótese dessa Tese é que a multiplicação de bactérias totais no biofilme lingual de crianças sob ventilação mecânica invasiva e a frequência dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* nesse biofilme lingual, podem variar de acordo com desfechos hospitalares, higiene bucal, presença de PAV, dias de hospitalização e dias sob VMI em UTI Pediátrica.

Diante de poucos estudos em crianças sob VMI sobre a quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual e desfecho hospitalar em UTI, foi proposta a realização desta tese com o objetivo investigar no Capítulo I a associação entre a quantidade de patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob VMI e desfecho hospitalar (alta e óbito) em UTI Pediátrica.

Além disso, o Capítulo II teve objetivo de investigar se existe associação entre quantificação relativa de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas em UTI, higiene bucal, desfecho hospitalar, dias de hospitalização, dias sob Ventilação Mecânica Invasiva e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Bactérias do biofilme lingual de crianças intubadas, PAV, dias de hospitalização e dias em ventilação mecânica invasiva

O biofilme do dorso da língua tem sido associado a infecções bacterianas, virais e/ou fúngicas em pacientes sob ventilação mecânica invasiva (VMI), pois atua como um nicho considerável de patógenos respiratórios (Tulio *et al.*, 2018). Viana *et al.*, (2023) realizaram um estudo em que a presença do biofilme lingual foi uma das alterações orais mais frequentes em paciente de UTI fato esse que pode contribuir para complicações no quadro sistêmico do paciente devido a possibilidade de surgirem infecções oportunistas na boca possibilitando, em pacientes intubados, a translocação bacteriana do meio oral para os pulmões via tubo orotraqueal (Sands *et al.*, 2017), podendo causar infecções sistêmicas graves como a Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) (Song *et al.*, 2023; Otsuji *et al.*, 2019), repercutindo significativamente nos custos hospitalares, nos dias de internação e dias em VMI (Mota *et al.*, 2017; Anvisa 2017).

A relação entre a microbiota oral e a ocorrência de infecções respiratórias como a PAV em pacientes da Unidade de Terapia Intensiva tem sido demonstrada em diversos estudos como o de Souza *et al.*, (2022). A PAV é uma infecção pulmonar hospitalar que acomete pacientes em ventilação mecânica em Unidades de Terapia Intensiva. Sua ocorrência, segundo estudos, estaria relacionada a mudanças na composição da microbiota da cavidade oral durante a internação, além da possibilidade de colonização do tubo endotraqueal por bactérias comensais orais ou respiratórias que se deslocam para as vias aéreas inferiores e aumentam o risco de PAV. Tais pesquisas mostram uma relação entre a microbiota oral e a PAV, esclarecendo que o tubo endotraqueal e o déficit de higiene oral predis põem ao acúmulo de colônias bacterianas na cavidade oral, de modo que alterações na flora da cavidade oral podem contribuir para desfechos pulmonares (Souza *et al.*, 2022).

Um maior tempo de exposição à VMI e a diminuição das defesas do organismo, também levam a um aumento do risco de contrair PAV de acordo com a pesquisa feita

em pacientes adultos por Sousa *et al.*, (2017). Os autores observaram que os patógenos presentes nos aspirados traqueais de pacientes intubados podem ser detectados em sua cavidade oral, especialmente naqueles que desenvolveram PAV ou pneumonia por aspiração confirmando a relação entre patógenos da microbiota oral, maior tempo de exposição à VMI e PAV (Chomton *et al.*, 2018; Cavalcante *et al.*, 2020).

Entre pacientes de Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP), mudanças na composição da microbiota da cavidade oral durante a internação levam a ocorrência de PAV que é a segunda infecção hospitalar mais comum, sendo responsável por 7% a 32% das infecções associadas aos cuidados de saúde e 10% de todas as infecções relacionadas com dispositivos pediátricos e, conforme Kohbodi; Rajasurya & Noor (2022), geralmente, a taxa de pneumonia em UTIP é menor do que em UTI de adultos. Os autores concluíram que os dados sobre bebês e crianças com PAV são limitados, portanto a maior parte das informações são de estudos em adultos sob VMI.

2.2 Patógenos respiratórios

2.2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete gram-negativo, aeróbio e não formador de esporos, capaz de causar uma variedade de infecções em hospedeiros imunocompetentes e imunocomprometidos. Sua predileção por causar infecções entre hospedeiros imunocomprometidos, extrema versatilidade, resistência a antibióticos e uma ampla gama de defesas dinâmicas tornam-no um organismo extremamente desafiador para o tratamento na medicina moderna. É comumente um patógeno oportunista e também uma causa importante de infecções nosocomiais em pacientes intubados internados em UTI, como pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (Lichtenberg *et al.*, 2022, Mulcahy, Isabella & Lewis, 2014).

A capacidade das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* de formar biofilme também é um mecanismo importante com o qual pode aumentar a resistência aos antibióticos e resistir às defesas do hospedeiro (Wilson & Pandey, 2023). O biofilme é uma arquitetura construída principalmente por substâncias poliméricas extracelulares autogênicas que

funcionam como um andaime para envolver as bactérias juntas em superfícies e protegê-las de estresses ambientais, impedir a fagocitose e, assim, conferir a capacidade de colonização e persistência a longo prazo (Thi *et al.*, 2020).

A *Pseudomonas aeruginosa* foi mencionada diversas vezes com relação ao seu potencial infeccioso e resistência microbiana, destacando-se entre os patógenos mais recorrentes em UTI Pediátrica (Rosa *et al.*, 2021; Gima *et al.*, 2020), sendo difícil de tratar, com taxas de morbidade e mortalidade de até 40% (Lichtenberg *et al.*, 2022) constituindo uma ameaça desafiadora para os sistemas de saúde (Halat *et al.*, 2022). Deve sua versatilidade patogênica a um grande arsenal de fatores de virulência secretados e associados a células que permitem a esse patógeno colonizar vários nichos dentro dos hospedeiros e protegê-los das suas defesas imunes inatas (Wood *et al.*, 2023).

2.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

A *Klebsiella pneumoniae* é uma espécie de bactéria gram-negativa, encapsulada, anaeróbia facultativa em forma de bastonete, normalmente coloniza as superfícies mucosas humanas da orofaringe e do trato gastrointestinal. Uma vez que a bactéria entra no corpo, ela pode apresentar altos graus de virulência e resistência a antibióticos (Ashurst & Dawson, 2023). É uma bactéria notória na prática clínica (Dai; Hu, 2022) sendo bem conhecido como um patógeno oportunista que pode causar infecções humanas invasivas, como bacteremia. Além disso, *Klebsiella pneumoniae* é a segunda causa mais comum de bacteremia gram-negativa, após *Escherichia coli* (E. coli) (Cubero *et al.*, 2018 ; Hyun *et al.*, 2018). A taxa de mortalidade relatada de KP variou amplamente de 11% a 81%. na maioria dos estudos (Falcone *et al.*, 2020 ; Balkan *et al.*, 2021 ; Meng *et al.*, 2022).

Tornou-se uma das principais causas de infecções nosocomiais respiratórias causando infecções disseminadas como a pneumonia adquirida em hospital (Paczosa; Meccas, 2016), com uma taxa de mortalidade crescente, particularmente em indivíduos imunocomprometidos, recém-nascidos e idosos (Glass, 2016). A *Klebsiella pneumoniae* é um organismo identificado como uma ameaça urgente à saúde humana pela Organização Mundial da Saúde (OMS), os European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) e o Public Health England (PHE), devido ao seu fácil contágio entre seres humanos, à sua virulência, aumento da resistência aos antibióticos e à sua ampla

distribuição geográfica (Glass, 2016). Esta também faz parte do acrônimo ESKAPE que compreende os nomes científicos de seis patógenos bacterianos altamente virulentos e resistentes a antibióticos, incluindo: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp* (Mulani *et al.*, 2019).

Pode colonizar sobre ou dentro dos hospedeiros, acompanhadas de crescimento e reprodução dos organismos, mas nenhum sintoma clínico é apresentado. Bactérias patogênicas colonizadas causam infecções relacionadas à assistência à saúde em momentos de redução da imunidade do hospedeiro, o que é uma importante causa de ocorrência clínica de complicações pós-operatórias e aumento da mortalidade em pacientes internados em UTI (Chen *et al.*, 2023), uma vez que muitos estudos relataram que o ambiente hospitalar pode ser um meio para a transmissão de patógenos aos pacientes (Facciola *et al.*, 2019)

Estudos tem mostrado que em UTI Pediátrica, a colonização oral por patógenos oportunistas dentre eles a *Klebsiella pneumoniae* tem sido significativamente maior em pacientes com ventilação mecânica em comparação com aqueles em ventilação espontânea ($p < 0,05$) (Pinheiro *et al.*, 2021) mostrando ainda que pacientes da UTIP estão suscetíveis à colonização por patógenos respiratórios e oportunistas desde as primeiras horas de internação (Pinheiro *et al.*, 2021; Tulio *et al.*, 2018)

2.3 Protocolo de Higiene Bucal em Unidade de Terapia Intensiva

Nos pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) sob ventilação mecânica invasiva (VMI), o biofilme do dorso da língua tem sido associado a infecções bacterianas, virais e/ou fúngicas, pois atua como um nicho considerável de patógenos respiratórios (Tulio *et al.*, 2018), possibilitando a translocação bacteriana do meio oral para os pulmões via tubo orotraqueal (Sands *et al.*, 2017). A colonização da microbiota oral normalmente acontece a partir de 48 horas após a intubação (Zhao *et al.*, 2020) e podem estar relacionadas à higienização bucal inadequada (Simões *et al.*, 2020; Tulio *et al.*, 2018).

A higiene bucal deficiente e a falta de eliminação mecânica levam à proliferação e ao acúmulo de biofilme resultando na colonização, que ocorre por diversos mecanismos. As secreções orais e as bactérias da placa dental possuem enzimas e citocinas que alteram a superfície do endotélio de forma que esteja mais susceptível a adesão e colonização por patógenos respiratórios. Além disso, há uma dificuldade na inspeção da cavidade oral e o acesso à higiene oral por conta do tubo orotraqueal aumentando o risco de infecção do trato respiratório inferior nos indivíduos suscetíveis (Prasad, Daly, Manley, 2019)

A implementação de um Protocolo de Higiene Bucal em pacientes intubados é de fundamental importância para diminuir o acúmulo desse biofilme, reduzindo as chances de desenvolvimento de PAV (Cordeiro *et al.*, 2022). Pesquisas tem mostrado que o digluconato de clorexidina 0,12%, tem sido utilizado com eficácia no pacote de cuidados em UTI Pediátrica na prevenção da PAV (de Neef *et al.*, 2019), bem como no controle do biofilme oral sendo considerado padrão ouro na limpeza bucal por se tratar de um antisséptico com amplo espectro (Barros, 2019; Melo *et al.*, 2019). Uma meta-análise incluindo 11 estudos randomizados abrangendo 1.769 pacientes relatou uma redução significativa do risco de PAV em pacientes com higienização com clorexidina (Lee *et al.*, 2019).

Corroborando ainda com esses achados, o estudo realizado por De Cristofano *et al.*, (2016) em UTI Pediátrica mostrou que a implementação durante um período de 2 anos de um pacote de prevenção de PAV que incluía higiene oral com clorexidina a 0,12% foi associada a uma taxa de redução em PAV de 25%. Cordeiro *et al.*, (2022) defendem que a higienização da cavidade oral se mostra eficaz na redução de incidência da PAV, sendo o método mais utilizado a limpeza química com clorexidina em concentrações variando de 0,12% a 2%.

Por outro lado, Karakaya *et al.*, (2022), concluíram que o uso de clorexidina em baixa concentração não traz benefícios em termos de desenvolvimento de PAV em crianças criticamente doentes com bactérias multirresistentes, o que também é defendido por Klompas *et al.*, (2022). Com o objetivo de destacar recomendações práticas para ajudar os hospitais de cuidados intensivos, Klompas *et al.*, (2022) não recomendam o uso da clorexidina nos cuidados orais de adultos, crianças, e recém-nascidos, uma vez que, os autores observaram que executar a higiene bucal diária com escovação dos dentes, mas

sem clorexidina, estava associada a taxas de PAV significativamente mais baixas. Dessa forma, faz-se necessário realizar cuidados preventivos e curativo em UTI adulto e pediátrica (Diamantino *et al.*, 2020)

O Protocolo de Higiene Bucal tem por objetivo o controle de biofilme bucal, hidratação dos tecidos intrabucal e peribucal, profilaxia de Infecção Associada à Assistência (IAS), implementação do Bundle de PAV e humanização do cuidado ao paciente crítico, sendo a execução realizada por técnico de enfermagem, a cada 8 horas, sob supervisão de cirurgião-dentista. (AMIB, 2014).

3. CAPÍTULO I

Quantificação relativa de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob ventilação mecânica invasiva e sua associação com desfecho hospitalar em Unidade de Terapia Intensiva

Artigo científico submetido Brazilian Oral Research

RESUMO

Objetivo: Investigar a associação entre a quantidade de patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob ventilação mecânica invasiva e desfecho hospitalar (alta e óbito) em UTI Pediátrica. **Desenho e Métodos:** Coorte conduzida com 24 pacientes em VMI, ambos sexos, com idade de 1 a 144 meses. Coleta do biofilme lingual ocorreu: no momento da intubação (T1) e 48 horas depois da primeira coleta (T2). Foi realizada extração do DNA das amostras e, para detecção do DNA das bactérias específicas, foram utilizados primers bacterianos para *Pseudomonas aeruginosa* e para *Klebsiella pneumoniae*. A detecção quantitativa das bactérias foi obtida pelo qPCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em Tempo Real, com o uso do reagente Syber Green no equipamento StepOne. Os testes Qui-quadrado ou exato de Fisher, teste McNemar e teste Mann-Whitney foram empregados a nível de significância de 5% para analisar associações entre a quantificação relativa, por meio do $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct), que é a diferença entre $\Delta CtT2$ e $\Delta CtT1$, e os desfechos hospitalares. **Resultados:** A quantidade das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual das crianças sob VMI não apresentaram diferenças significativas entre os grupos alta e óbito. Observou-se que em T2, o percentual de *Pseudomonas aeruginosa* presentes no biofilme lingual dos pacientes que foram a óbito foi estatisticamente mais elevado que nos pacientes que receberam alta hospitalar (90% versus 40%; $P = 0,033$), mesmo depois de ajustados para os demais fatores de confusão (OR ajustado = 39,2% ; IC95% = 1,07-1485; $P = 0,048$). **Conclusão:** A presença da *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme lingual de crianças sob VMI parece mais importante do que a sua quantidade para associação com óbito em UTI Pediátrica. **Implicações práticas:** Contribuições para cuidados de saúde, salientando a importância

de estudos focados na presença bacteriana no biofilme lingual de crianças sob VMI em UTI Pediátrica para traçar estratégias de saúde pública visando seu controle.

Palavras chave: Biofilme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, UTI Pediátrica, Ventilação Mecânica.

INTRODUÇÃO

O biofilme do dorso da língua de pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) sob ventilação mecânica invasiva (VMI), tem sido associado a infecções bacterianas, virais e/ou fúngicas, pois atua como um nicho considerável de patógenos respiratórios e oportunistas (Tulio *et al.*, 2018; Pinheiro *et al.* 2021), possibilitando assim a translocação bacteriana do meio oral para os pulmões via tubo orotraqueal (Cordeiro *et al.*, 2022).

A VMI é uma das intervenções mais comuns nas UTIs (Oliveira & Cardoso, 2023) sendo um recurso terapêutico artificial utilizado na UTI Pediátrica, com a finalidade de equilíbrio da ventilação e/ou oxigenação, podendo ser realizada através de intubação orotraqueal (Costa *et al.*, 2021). Nos pacientes em VMI, alterações na microbiota oral por microorganismos patogênicos normalmente acontecem a partir de 48 horas após a intubação podendo causar infecções respiratórias como a pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (Zhao *et al.*, 2020).

Os principais patógenos envolvidos incluem bactérias gram-negativas multirresistentes tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (Kohbodi *et al.*, 2022). Estudos tem mostrado que a falha no sistema de defesa do organismo dos pacientes em VMI na eliminação desses microrganismos infectantes, favorece a sua multiplicação no biofilme oral (Keane; Martin-Loeches, 2019), de forma que pacientes infectados por esses patógenos multirresistentes tem os piores desfechos com maior mortalidade (Oliveira *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2023; Carvalho *et al.*, 2021).

Dessa forma, faz-se necessário reforçar a importância de estudos focados na quantificação bacteriana no biofilme lingual de crianças sob VMI para traçar estratégias de saúde pública visando seu controle. A hipótese deste artigo é que a frequência dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob ventilação mecânica invasiva podem variar de acordo com desfechos hospitalares em UTI Pediátrica.

Diante de poucos estudos em crianças sob VMI sobre a quantificação de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual e desfecho hospitalar em UTI, foi proposta a realização deste estudo com o objetivo investigar a associação entre a quantidade de patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob VMI e desfecho hospitalar (alta e óbito) em UTI Pediátrica.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo e Tipo de amostra

Um estudo tipo coorte de curto prazo foi realizado de março a dezembro do ano de 2019, com amostra de conveniência na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - Unidade Materno Infantil (HUUFMA-UMI), São Luís, Maranhão, Brasil.

Seleção da amostra

Foram incluídas crianças de ambos os sexos, com idade de 1 a 144 meses que estavam em ventilação mecânica invasiva (VMI) e que ao darem entrada na UTIP foram intubados. Os critérios de exclusão adotados foram: pacientes com episódio prévio de aspiração do conteúdo gástrico, com doença pulmonar obstrutiva crônica, portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida, com pneumonia comunitária e transplantados de órgãos. Também foram excluídos os participantes que tiveram alta ou óbito, em período inferior a 48 horas após a intubação, bem como os casos não autorizados pela equipe médica devido a debilidade do paciente.

Desse modo, do total dos 217 pacientes internados durante o período da coleta do biofilme lingual (março a dezembro de 2019) na UTI Pediátrica do HUUFMA-UMI, foi obtida a amostra final de 24 crianças, todas em VMI.

Dados de estudo

O tipo de dentição (ausente, decídua, mista e permanente), frequência de alterações orais (cárie dental; alterações periodontais; úlcera oral) e higiene oral (satisfatória= ausência de biofilme lingual visível; insatisfatória= presença de biofilme lingual visível) foram obtidos durante o exame clínico no tempo 1 (T1) por serem dados primários. Dados secundários foram obtidos nos prontuários, a especificar: idade (1 a 99 meses; 100 a 144 meses), sexo (feminino; masculino), tempo de internação (6 a 20 dias; 21 a 40 dias; 41 a 69 dias), tempo de Ventilação Mecânica Invasiva (2 a 10 dias; 11 a 20 dias; 21 a 35 dias) e desfecho do período de internação (alta; óbito).

Coleta de biofilme lingual

O biofilme foi coletado (de março a dezembro de 2019) do dorso da língua das crianças em VMI em dois momentos: no momento da intubação (T1) e 48 horas depois da primeira coleta (T2). Foi utilizado swab estéril sendo este friccionado no dorso da língua de cada paciente e, logo em seguida, foi acondicionado em tubo do tipo Falcon de 15ml estéril contendo 3mL de solução TNE [17 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl e 7 mM EDTA] diluídos em etanol 66% (Aidar & Line 2007). A primeira coleta do biofilme lingual ocorreu no momento da intubação, antes da execução do Protocolo de Higiene Bucal adotado na UMI – HUUFMA, e a segunda coleta do biofilme (48 horas depois da primeira). Foram obtidas 48 amostras de biofilme lingual que ficaram armazenadas em freezer -20° até a extração do DNA bacteriano do material biológico coletado.

Higiene Bucal dos participantes

Os participantes foram inseridos na rotina de cuidados por meio do Protocolo de Higiene Bucal (adotado na UMI – HUUFMA) definido pelo Departamento de Odontologia da Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) em 2011 (Amib 2014). Foi respeitada a rotina do Hospital na qual a equipe de técnicos de enfermagem treinadas e sob a supervisão do cirurgião dentista realizam três vezes ao dia a higiene oral dos paciente em VMI, utilizando solução aquosa de digluconato de clorexidina à 0,12%, com o auxílio de espátula de madeira (abaixador de língua) e compressas de gaze.

As etapas iniciais (não laboratoriais) da pesquisa estão ilustradas na **Figura 1**.

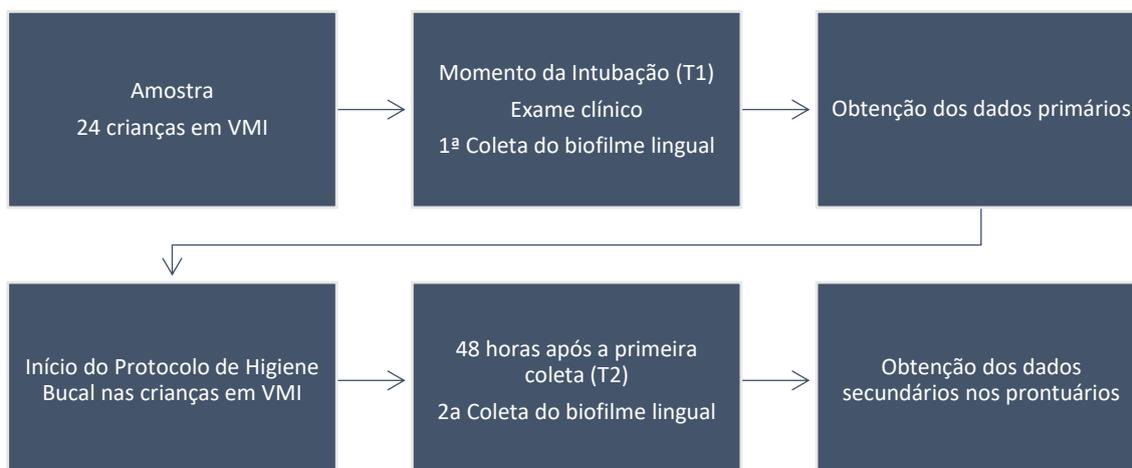


Figura 1. Fluxograma das etapas iniciais (não laboratoriais) da pesquisa.

Extração do DNA das amostras coletadas nos dois momentos (T1 e T2)

A extração de DNA foi realizada como descrito pelo manual de uso do PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi submetido a uma dosagem no espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para avaliação da sua concentração e integridade. Todo o material ficou congelado em freezer -20°.

Deteção e Quantificação por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (q-PCR)

Foi utilizado um par de primer bacteriano universal 16S (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' e GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT) para deteção do DNA das bactérias totais presentes nas amostras biológicas. (Hortz *et al.*, 2005; Zucol *et al.*, 2006). Os primers específicos foram: 5'-GTTAGAAAAGGAAAAGTATG-3' e 5'-TGCTGCAACGACTTGTTAG-3 para *Pseudomonas aeruginosas* (Hanson *et al.*, 2006) e 5'-TGA CCC TGA GCG GCG AAA GC-3' e 5'-CAC AGC GGC AGC AAG AAA GC-3' para *Klebsiella pneumoniae* (Kitchel *et al.*, 2009). A qPCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em Tempo Real permitiu a

quantificação relativa (que analisa as alterações da expressão ou abundância gênica bacteriana de um determinado momento em relação a outro) das bactérias detectadas e amplificadas em cada ciclo da reação. (Hortz *et al.*, 2005; Zucol *et al.*, 2006). Foram utilizadas placas de 48 poços com 20 μL de uma solução contendo 10 μL do reagente Syber Green PCR Master Mix (corante responsável por ligações altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 1 μL do primer F, 1 μL do primer R, 7 μL de água e 1 μL de DNA da amostra. Em seguida, a placa foi inserida no equipamento StepOne (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) onde ocorreram os ciclos da reação. O ciclo consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 15s, anelamento a 54°C por 15s e extensão a 72°C por 30s. A curva Ct (threshold cycle) indica o número do ciclo fracionário em que a quantidade de alvo amplificado atinge um limiar fixo (Hortz *et al.*, 2005). Os níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico alvo na amostra (ou seja, quanto mais baixo o nível Ct, maior é a quantidade de ácido nucleico/mais bactérias). O ΔCt (delta Ct) consiste na diferença de expressão entre o alvo e o controle da amostra (média de *Pseudomonas aeruginosas* ou *Klebsiella pneumoniae* – média do primer bacteriano universal 16S) sendo que o ΔCt positivo indica menos bactérias e o ΔCt negativo, maior quantidade de bactérias. Os resultados foram analisados com base no método de quantificação dos dados da qPCR, o $\Delta\Delta\text{Ct}$ (delta delta Ct), que é a diferença entre ΔCtT2 e ΔCtT1 , resultando na variação quantitativa das bactérias de cada amostra. (Livak, Schmittgent 2001). Todas as amostras do material biológico foram processadas em triplicata.

Análise estatística

A análise de dados foi realizada utilizando os recursos dos softwares GraphPad Prism versão 10.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) e R statistical package versão 4 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Inicialmente, a estatística descritiva foi realizada utilizando medidas de frequência absoluta, relativa, média e desvio-padrão ($\pm\text{dp}$). A dependência da distribuição entre as variáveis categóricas foi avaliada com os testes Qui-quadrado ou exato de Fisher. O teste McNemar foi

utilizado para verificar a presença/ausente de cada patógeno nos dois tempos de estudo. O teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar a quantidade do patógenos entre os grupos de desfecho hospitalar (alta e óbito). Além disso, um modelo de regressão logística foi utilizado para estimar a associação da presença dos patógenos com a ocorrência de óbito, ajustada para os fatores idade e tempo de sob ventilação mecânica. Este modelo estimou as medidas do Odds ratio ajustado ($OR_{ajustado}$) e respectivo intervalo de confiança a 95% (IC95%). O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$).

Considerações Éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA (CAAE: 65013316.7.0000.5086). Os pais ou responsáveis legais das crianças envolvidas foram informados do caráter do estudo e assinaram a um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” para permitir a participação dos seus filhos na pesquisa.

RESULTADOS

A **Tabela 1** apresenta a descrição geral da amostra. A maior parte das crianças apresentava idade até 24 meses (58,3%). A média do tempo de internação e tempo sob ventilação mecânica foi de, respectivamente, $22,7 \pm 16,4$ e $12,2 \pm 8,8$ dias. 37,5% não apresentavam dentes erupcionados, a presença de alterações na mucosa oral foi baixa na amostra (<15%) e 58,3% dos pacientes apresentaram higiene oral insatisfatória.

Tabela 1. Distribuição das variáveis de caracterização geral dos pacientes incluídos.

Variáveis	média	$\pm dp$	N	(%)
Dados demográficos				
Sexo				
Feminino			9	(37,5)
Masculino			15	(62,5)
Faixa etária				
Até 24 meses			14	(58,3)
Mais que 24 meses			10	(41,7)
Dados hospitalares				
Tempo de internação (em dias)	22,7	$\pm 16,4$		
Tempo em ventilação mecânica (em dias)	12,2	$\pm 8,8$		
Dados de saúde oral				
Tipo de dentição				
Ausente			9	(37,5)
Decídua			7	(29,2)
Mista			7	(29,2)
Permanente			1	(4,1)
Frequência de alterações orais				
Alteração periodontal				
Não			22	(91,7)
Sim			2	(8,3)
Cárie dental				

Não	21	(87,5)
Sim	3	(12,5)
Úlcera oral		
Não	21	(87,5)
Sim	3	(12,5)
Avaliação de higiene oral		
Satisfatória (ausência de biofilme lingual visível)	10	(41,7)
Insatisfatória (presença de biofilme lingual visível)	14	(58,3)
Desfecho do período de internação		
Alta	15	(62,5)
Óbito	9	(37,5)

±dp = desvio-padrão.

A **Tabela 2** analisa a associação entre a presença dos patógenos avaliados nos tempos de estudo com a presença ou ausência de sinal clínico de biofilme lingual visível. Não se observou associações significantes entre a presença dos patógenos nos tempos avaliados com a presença ou ausência de biofilme lingual visível na amostra estudada.

Tabela 2. Associação entre a presença dos patógenos nos tempos de estudo com a presença ou ausência de biofilme lingual visível.

Variáveis	Biofilme lingual		P
	Ausência de biofilme lingual visível	Presença de biofilme lingual visível	
	n (%)	n (%)	
	<i>Pseudomonas aeruginosa (T1)</i>		
Ausente	2 (20,0)	8 (57,1)	
Presente	8 (80,0)	6 (42,9)	
<i>Pseudomonas aeruginosa (T2)</i>		0,678	

Ausente	3 (30,0)	6 (42,9)	
Presente	7 (70,0)	8 (57,1)	
<i>Klebsiella pneumoniae (T1)</i>			0,484
Ausente	5 (50,0)	9 (64,3)	
Presente	5 (50,0)	5 (35,7)	
<i>Klebsiella pneumoniae (T2)</i>			0,104
Ausente	8 (80,0)	6 (42,9)	
Presente	2 (20,0)	8 (57,1)	

Teste qui-quadrado ou exato de Fisher. *Diferenças significantes (P <0,05).

Na **Figura 2** observa-se a associação da presença dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob VMI com desfecho hospitalar alta (15 pacientes) e óbito (9 pacientes) dentro dos tempos de estudo T1 (A,C) e T2 (B,D), revelando que em T2 (B), o percentual de *Pseudomonas aeruginosa* presentes no biofilme lingual dos pacientes que foram a óbito foi estatisticamente mais elevado que nos pacientes que receberam alta hospitalar (90% versus 40%; P = 0,033).

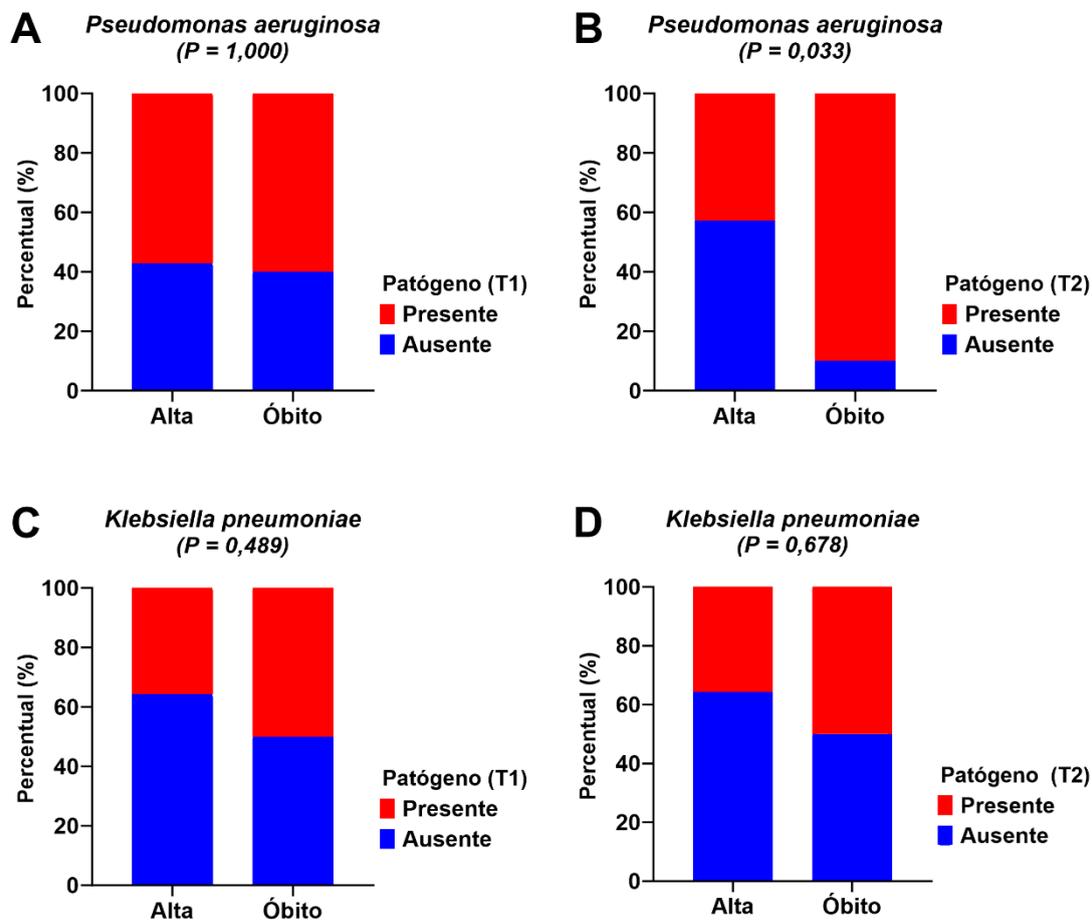


Figura 2. Associação da presença da *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual das crianças sob VMI nos dois tempos da coleta T1 (A, C) e T2 (B, D) com desfecho hospitalar (alta e óbito). Teste qui-quadrado ou exato de Fisher.

Quando analisada a quantidade dos patógenos no biofilme lingual das crianças sob VMI, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos (**Figura 3**), uma vez que não variou a quantidade de bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*) quanto ao desfecho alta ou óbito.

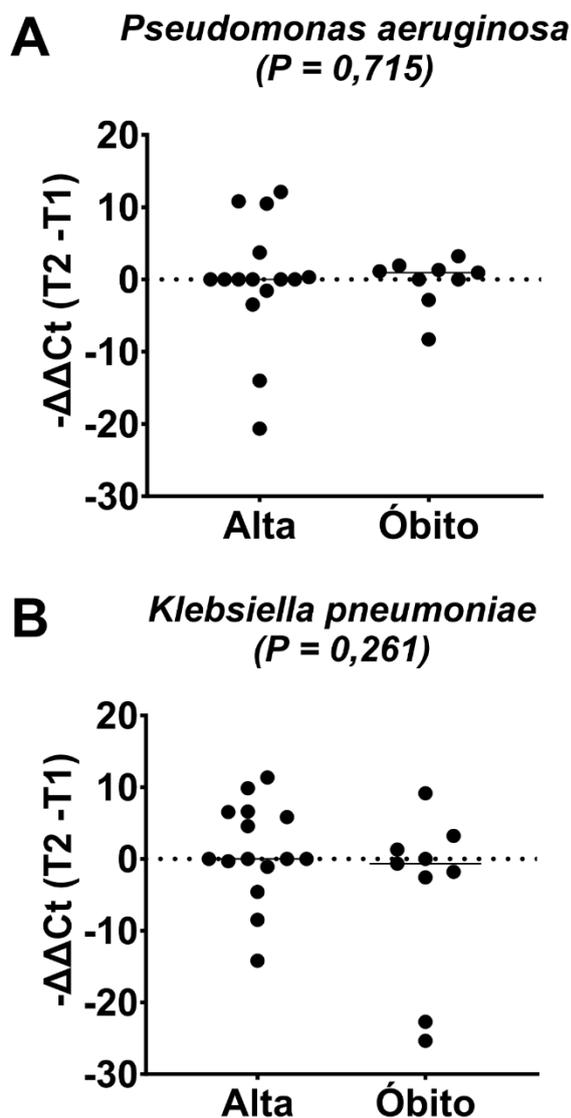


Figura 3. Análise comparativo da quantidade de patógenos *Pseudomonas aeruginosa* (A) e *Klebsiella pneumoniae* (B) entre os desfechos hospitalares alta e óbito. Teste Mann-Whitney.

Por fim, a análise de regressão logística multivariada, ilustrada na **Figura 4**, da associação da presença dos patógenos no biofilme lingual de crianças intubadas, ajustada para idade e tempo de sob VMI sobre a ocorrência de óbito, reforçou que a presença de *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme lingual em T2 foi associada com o desfecho óbito mesmo depois de ajustados para os demais fatores de confusão (OR ajustado = 39,2% ; IC95% = 1,07-1485; $P = 0,048$).

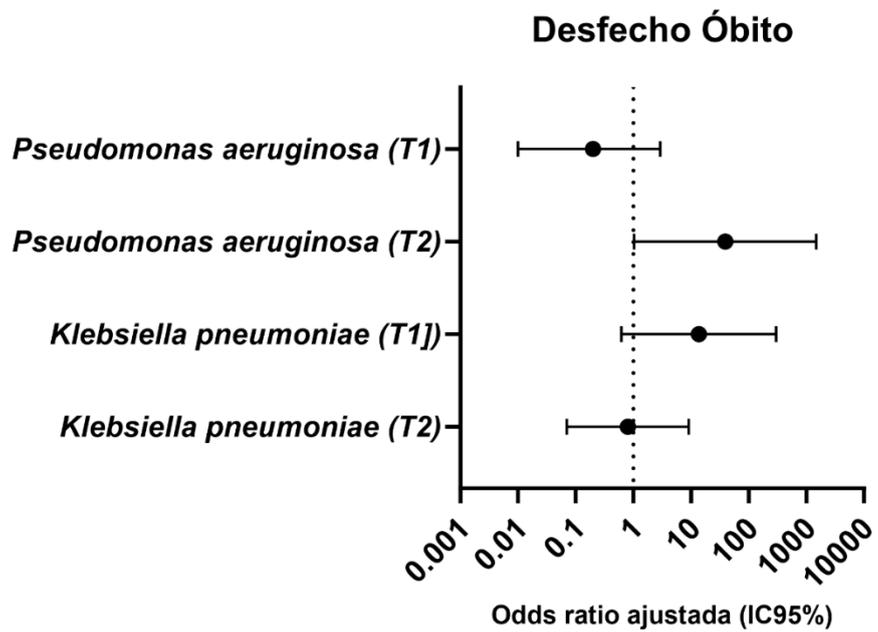


Figura 4. Regressão logística multivariada da associação da presença dos patógenos ajustada para idade e tempo de sob VMI sobre a ocorrência de óbito na amostra avaliada.

DISCUSSÃO

Esta investigação traz contribuições para os cuidados em saúde oral, salientando a importância de realizar estudos abrangentes focados na presença e quantificação bacteriana no biofilme lingual de crianças sob VMI a fim de traçar estratégias de saúde pública visando seu controle em UTI Pediátrica.

No presente estudo, as 24 crianças internadas na UTI Pediátrica, tiveram a média do tempo de internação e tempo sob ventilação mecânica de, respectivamente, $22,7 \pm 16,4$ e $12,2 \pm 8,8$ dias mostrando resultado similar ao de pesquisas em que o tempo de internação foi menor ou igual a 30 dias (57,6%) e o tempo de ventilação mecânica em torno de 15 dias (74,6%) (Nóbrega *et al.*, 2021; Durães *et al.*, 2023)

Ao testar a associação entre a presença dos patógenos avaliados nos tempos de estudo com a presença ou ausência de sinal clínico de biofilme lingual visível não se observou associações significantes na presente pesquisa, apesar de ter sido detectada a presença de patógenos respiratórios mesmo em casos de ausência de sinal clínico de biofilme lingual visível. Tal informação torna-se relevante, porque o biofilme consiste em uma arquitetura construída principalmente por substâncias poliméricas extracelulares autogênicas que funcionam como uma estrutura para envolver as bactérias em superfícies e protegê-las de estresses ambientais, impedindo a fagocitose e conferindo assim a capacidade de colonização e persistência a longo prazo (Thi *et al.*, 2020).

Destaca-se que nas infecções relacionadas a ambiente hospitalar com presença de patógenos no biofilme oral de pacientes usando tubo orotraqueal, as bactérias podem subsequentemente sofrer dispersão, permitindo que suas formas planctônicas causem potencialmente infecção disseminada (Maurice, Bedi & Sadikot, 2018) como a pneumonia associada a ventilação mecânica (PAV) cuja taxa de ocorrência chegou a 33,3% dos paciente que estavam sob uso de aparelhos de ventilação mecânica orotraqueal (Sousa, Costa & Prado, 2023).

A associação da presença dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* no biofilme lingual de crianças sob VMI com desfecho hospitalar alta (15 pacientes) e óbito (9 pacientes) dentro dos tempos de estudo (T1 e T2), revelou que em T2, o percentual de *Pseudomonas aeruginosa* presentes no biofilme lingual dos pacientes

que foram a óbito foi estatisticamente mais elevado que nos pacientes que receberam alta hospitalar (90% versus 40%; $P = 0,033$). *Pseudomonas aeruginosa* é um importante patógeno agente de infecções respiratórias em UTI Pediátrica (Rosa *et al.*, 2021) sendo difícil de tratar e constitui uma ameaça desafiadora para os sistemas de saúde (Halat *et al.*, 2022) com taxas de morbidade e mortalidade de até 40% (Wood *et al.*, 2023).

A presença de microrganismos identificados como causadores de infecção respiratória foi associada com a taxa de óbitos dos pacientes intubados na UTI Adulto, sendo que a *Pseudomonas aeruginosa* aumentou gradativamente sua resistência com o tempo (Miléo, 2019). Patógenos multirresistentes em pacientes infectados levam aos piores desfechos quando comparados com pacientes infectados por cepas sensíveis levando a ventilação mecânica prolongada, tempo prolongado de internação na UTI e maior mortalidade (Oliveira *et al.*, 2023).

No presente estudo, quando analisada a quantidade dos patógenos no biofilme lingual das crianças sob VMI, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos alta (15 pacientes) e óbito (9 pacientes), uma vez que não variou a quantidade de bactérias *Pseudomonas aeruginosas* ($p=0,715$) e *Klebsiella pneumoniae* ($p=0,261$) quanto ao desfecho hospitalar. Sabe-se que o desfecho óbito possui inúmeros fatores envolvidos e que devem ser estudados detalhadamente como a idade do paciente, doença de base, resistência bacteriana, condições hospitalares, dentre outros, para que possa se estabelecer uma relação mais detalhada do que realmente leva o paciente ao óbito (Miléo, 2019).

Ao se realizar a análise de regressão logística multivariada, da associação da presença dos patógenos no biofilme lingual de crianças intubadas, ajustada para idade e tempo de sob VMI sobre a ocorrência de óbito, ratificou que a presença de *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme lingual em T2 foi associada com o desfecho óbito mesmo depois de ajustados para os demais fatores de confusão (OR ajustado = 39,2% ; IC95% = 1,07-1485; $P = 0,048$). O estudo conduzido em três unidades de terapia intensiva (UTI) do Centro Médico Infantil, mostrou mortalidade hospitalar por infecção por *Pseudomonas aeruginosa* de 6,2% (Huang *et al.*, 2023). Portanto, faz-se necessário o desenvolvimento de estratégias de controle e redução da presença desses patógenos a fim de prevenir infecções respiratórias graves (Muntaz *et al.* 2023).

No presente estudo foram realizadas duas coletas do biofilme lingual em um único grupo de estudo sendo que não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos quanto ao desfecho alta ou óbito e a quantidade dos patógenos *Pseudomonas aeruginosa* ($p=0,715$) e *Klebsiella pneumoniae* ($p=0,261$). Porém, o percentual de *Pseudomonas aeruginosa* presentes no biofilme lingual dos pacientes que foram a óbito foi estatisticamente mais elevado que nos pacientes que receberam alta hospitalar (90% versus 40%; $P = 0,033$). Desse modo, a presença de *Pseudomonas aeruginosa* parece mais importante do que a sua quantidade para a associação com óbito, sendo um dado relevante, uma vez que a invasão bacteriana, especialmente por *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, no trato respiratório inferior é capaz de provocar infecções respiratórias, na maioria dos casos, por meio da aspiração do conteúdo da orofaringe, colaborado pela falha no sistema de defesa do organismo na eliminação de microrganismos infectantes (Keane & Martin-Loeches, 2019).

O ponto forte deste estudo está na realização da técnica PCR que oferece um benefício importante, uma vez que permite a quantificação relativa (que analisa as alterações da expressão ou abundância gênica bacteriana de um determinado momento em relação a outro) de qualquer tipo de DNA bacteriano presente numa amostra (Bankur *et al.*, 2014; Horz *et al.*, 2005; Drancourt *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1990). Esta investigação traz contribuições para os cuidados de saúde, salientando a importância de estudos focados na quantificação bacteriana do biofilme lingual de crianças sob VMI para traçar estratégias de saúde pública visando seu controle.

CONCLUSÃO

Foi possível observar que a presença de *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme lingual de crianças sob Ventilação Mecânica Invasiva parece mais importante do que a sua quantidade para associação com óbito em UTI Pediátrica.

REFERÊNCIAS

Tulio KSC, Stramandinoli-Zanicotti RT, Dirschnabel AJ, Schussel JL, Wasilewski JHS, Krelling A, Beltrame, OC, Martins, CRW, Sassi, LM. Changes in the oral microbiota profile during ICU stay: colonization by potential respiratory pathogens. *Arch Health Invest.* (2018);7(9):351-357. DOI: <https://doi.org/10.21270/archi.v7i9.3009>

Pinheiro CLS, Lima FP, Machado FC, Santos SS, Malheiro ARX, Ataíde LA, Figueiredo ACL. Oral and tracheal microbiota of pediatric and adolescent patients in an intensive care unit. *Spec Care Dentist.* 2021 Sep;41(5):599-606. doi: 10.1111/scd.12602. Epub 2021 May 9. PMID: 33966288.

Cordeiro LC; Ribeiro JRV; Amaral AAG; Werneck JT. The importance of implementing an oral hygiene protocol for intubated patients: a literature review. - *International journal of science dentistry | available [Internet].* 2022;57(1):135-146. <https://periodicos.uff.br/ijosd>

Oliveira JDS, Cardoso FM. Early mobilization in patients undergoing invasive mechanical ventilation (IMV) for functional recovery. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO* 2023;20(43); p. 213. DOI: 10.18677/EnciBio_2023A18

Costa GS, Lima DB, Torres RLN, Manso MLC, Santos OC dos; Silva JÁ da, Silva MMM da, Oliveira DAL, Medeiros RRS. Nursing care in preventing pneumonia associated with mechanical ventilation. *Ciência Plural.* 2021;7(3):272-289. DOI: 10.21680/2446-7286.2021v7n3ID22301.

Zhao T, Wu X, Zhang Q, Li C, Worthington HV, Hua F. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020 Dec 24;12(12):CD008367. doi: 10.1002/14651858.CD008367.pub4. PMID: 33368159; PMCID: PMC8111488.

Kohbodi GA, Rajasurya V, Noor A. Ventilator-Associated Pneumonia. 2022 Sep 10. In: *StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan—.* PMID: 29939533.

Keane S, Martin-Loeches I. Host-pathogen interaction during mechanical ventilation: systemic or compartmentalized response? *Crit Care*. 2019 Jun 14;23(Suppl 1):134. doi: 10.1186/s13054-019-2410-0. PMID: 31200727; PMCID: PMC6570626.

Huang W, Wei X, Xu G, Zhang X, Wang X. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in critically ill children: Prevalence, risk factors, and impact on outcome in a large tertiary pediatric hospital of China. *Front Public Health*. 2023 Feb 9;11:1088262. doi: 10.3389/fpubh.2023.1088262. PMID: 36844819; PMCID: PMC9948009.

Carvalho JJV de, Boaventura FG, Silva A de CR da, Ximenes RL, Rodrigues LKC, Nunes DA de A, Souza VKG de. Multiresistant bacteria and their impacts on public health: A social responsibility. *RSD* [Internet]. 2021 Jun.10 [cited 2023 Nov.2];10(6):e58810616303. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16303> DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.16303>

Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. *Braz Dent J*. 2007;18(2):148-52. doi: 10.1590/s0103-64402007000200012. PMID: 17982556.

Amib. Brazilian intensive care medicine association- [Internet]. 2014 [cited 2023 Nov. 2]

Horz HP, Vianna ME, Gomes BP, Conrads G. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. *J Clin Microbiol*. 2005 Oct;43(10):5332-7. doi: 10.1128/JCM.43.10.5332-5337.2005. PMID: 16208011; PMCID: PMC1248440.

Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, Nadal D. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J Clin Microbiol*. 2006 Aug;44(8):2750-9. doi: 10.1128/JCM.00112-06. PMID: 16891488; PMCID: PMC1594602.

Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Jun;50(6):2272-3. doi: 10.1128/AAC.01440-05. PMID: 16723605; PMCID: PMC1479107.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Aug;53(8):3365-70. doi: 10.1128/AAC.00126-09. Epub 2009 Jun 8. PMID: 19506063; PMCID: PMC2715580.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

Nóbrega LM, Vasconcelos JM, Morais JL, Araújo CC, Ramalho Neto JM, Leite AC. Pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes graves de uma unidade de terapia intensiva. *Enferm Foco*. 2021;12(4):746-52. DOI: <https://doi.org/10.21675/2357-707X.2021.v12.n4.4525>

Durães RR, Soares ACM, Varanda ALC, Fagundes PTM, Nascimento AFC, Silva GF, Lopes JVN, Silva CTN, Roque ELLS, Araújo JVS, Rocha REC, Barbosa MLC. Prevalência de complicações respiratórias na unidade de terapia intensiva adulto. *Braz. J. Implantol. Health Sci.* [Internet]. 12º de junho de 2023 [citado 2º de novembro de 2023];5(3):313-24. Disponível em: <https://bjih.emnuvens.com.br/bjih/article/view/283DOI:https://doi.org/10.36557/2674-8169.2023v5n3p313-324>

Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 17;21(22):8671. doi: 10.3390/ijms21228671. PMID: 33212950; PMCID: PMC7698413.

Maurice NM, Bedi B, Sadikot RT. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms: Host Response and Clinical Implications in Lung Infections. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018 Apr;58(4):428-439. doi: 10.1165/rcmb.2017-0321TR. PMID: 29372812; PMCID: PMC5894500.

Sousa SL, Costa SM, Prado FO. Oral manifestations in patients admitted to the ICU of a Public Hospital. *Rev. Ciênc. Med. Biol*. 2023;22(1):68-75. DOI: <http://doi.org/10.9771/cmbio.v22i1.49817>.

Rosa LN, Castro AP de, Lima WG de, Simião DC, Paiva MC de. Ventilator-associated pneumonia from polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A systematic review. RSD [Internet]. 2021 Oct 21 [cited 2023 Nov 2];10(13):e555101321480. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21480>. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21480>

Halat DH, Moubareck CA. The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. Yale J Biol Med. 2022 Dec 22;95(4):507-515. PMID: 36568831; PMCID: PMC9765337.

Wood SJ, Goldufsky JW, Seu MY, Dorafshar AH, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxins: Mechanisms of Cytotoxicity and Impact on Inflammatory Responses. Cells. 2023 Jan 3;12(1):195. doi: 10.3390/cells12010195. PMID: 36611990; PMCID: PMC9818787.

Miléo FC. Avaliação da alteração da microbiota bucal de pacientes internados em unidade de terapia intensiva [dissertação]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2019.

Oliveira ABS, Sacilotto GH, Neves MFB, Silva AHN, Moimaz TA, Gandolfi JV, Nogueira MCL, Lobo SM. Prevalence, outcomes, and predictors of multidrug-resistant nosocomial lower respiratory tract infections among patients in an ICU. J Bras Pneumol. 2023;49(1):e20220235. ISSN 1806-3756 DOI: 10.36416/1806-3756/e20220235

Mumtaz H, Saqib M, Khan W, Ismail SM, Sohail H, Muneeb M, Sheikh SS. Ventilator associated pneumonia in intensive care unit patients: a systematic review. Ann Med Surg (Lond). 2023 May 12;85(6):2932-2939. doi: 10.1097/MS9.0000000000000836. PMID: 37363470; PMCID: PMC10289715.

Bankur PK, Nayak A, Bhat K, Bankur R, Naik R, Rajpoot N. Comparison of culture and polymerase chain reaction techniques in the identification of *Tannerella forsythia* in periodontal health and disease, an in vitro study. J Indian Soc Periodontol. 2014 Mar;18(2):155-60. doi: 10.4103/0972-124X.131312. PMID: 24872621; PMCID: PMC4033879.

Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable

bacterial isolates. *J Clin Microbiol.* 2000 Oct;38(10):3623-30. doi: 10.1128/JCM.38.10.3623-3630.2000. PMID: 11015374; PMCID: PMC87447.

Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990 Sep;28(9):1942-6. doi: 10.1128/jcm.28.9.1942-1946.1990. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1991 Mar;29(3):666. PMID: 2095137; PMCID: PMC268083.

4. CAPÍTULO II

Quantificação relativa de bactérias totais no biofilme lingual de crianças intubadas em Unidade de Terapia Intensiva, higiene bucal, desfecho hospitalar, dias de hospitalização, dias sob ventilação mecânica invasiva e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica: existe associação?

Artigo científico submetido no Journal of Child Health Care

RESUMO

Objetivo: Investigar se existe associação entre quantificação relativa de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas em UTI, higiene bucal, desfecho hospitalar, dias de hospitalização, dias sob Ventilação Mecânica Invasiva e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica. **Desenho e Métodos:** Coorte conduzida com 24 pacientes em VMI, ambos sexos e idade de 1 a 144 meses. Coleta do biofilme lingual ocorreu: no momento da intubação (T1) e 48 horas depois da primeira coleta (T2). Foi realizada extração do DNA das amostras e utilizado um par de primer bacteriano universal 16S para detecção do DNA das bactérias totais presentes nessa amostra por meio da qPCR (Reação da Cadeia de Polimerase) em Tempo Real. O teste T pareado foi usado para a análise comparativa entre os tempos de coleta do biofilme (T1 e T2) e teste T independente para a análise comparativa do biofilme no mesmo tempo entre as categorias de indicadores hospitalares (presença de PAV, dias de hospitalização e dias em VMI). O nível de significância a 5% foi adotado para todos os testes. **Resultados:** Observou-se que houve significativa diminuição na quantificação de patógenos do biofilme lingual (maior Ct = menor quantidade de bactérias) entre os dois tempos de estudo (Ct T1= 25,15±6,17 e CtT2=27,23±5,61), após a execução do protocolo de Higiene Bucal, utilizando solução aquosa de digluconato de clorexidina à 0,12%, com o auxílio de espátula de madeira (abaixador de língua) e compressas de gaze. Por meio da quantificação relativa através do método $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct), observa-se menor expressão relativa de bactérias totais nas crianças que tiveram alta (73.093) que aquelas que vieram a óbito (114.380), revelando tendência destas últimas apresentarem maior colonização de bactérias totais no biofilme lingual, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos ($p>0,05$,

Teste de Mann-Whitney). Não houve diferença significativa entre ΔCt e dias de hospitalização ($r = -0,279$; $P = 0,185$), porém mostrou diferença estatística na correlação negativa entre ΔCt e quantidade de dias em VMI ($r = -0,422$ e $p = 0,040$), com magnitude moderada e coeficiente de determinação (r^2) de 0,178, revelando que a maior quantidade dos participante (ΔCt positivo=menos bactérias) com maior controle do biofilme lingual ficaram menos tempo em VMI, com variância compartilhada de 17,8%. A análise ajustada para a idade mostrou medida estatística limítrofe (coeficiente = $-0,41$, $P = 0,053$) para a relação entre ΔCt e dias em VMI, indicando que não houve evidência suficientemente forte para provar a associação. **Conclusão:** A execução de um Protocolo de Higiene Bucal mostrou ser um instrumento eficaz na diminuição da quantificação de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas em Unidade de Terapia Intensiva, com menor quantificação relativa de bactérias totais no biofilme lingual das crianças que tiveram alta e tendência, das que foram a óbito, apresentarem maior colonização de bactérias totais neste biofilme. Os participantes com maior controle do biofilme lingual, (ΔCt positivo=menos bactérias), ficaram menos tempo em Ventilação Mecânica Invasiva. Desse modo, esses pacientes são mais beneficiados quando realizado o Protocolo de Higiene Bucal. Porém no presente estudo. não foi possível observar forte associação com dias de hospitalização. **Implicações práticas:** Contribuições para cuidados de saúde, salientando a importância do desenvolvimento e implementação de um PHB em uma UTI Pediátrica a fim de reduzir a quantificação relativa de bactérias do biofilme lingual de crianças intubadas e reduzir dias em ventilação mecânica invasiva.

Palavras chave: Biofilme, Ventilação Mecânica, Pneumonia Associada a Ventilação Macânica, UTI Pediátrica, PCR em tempo real, Higiene Bucal.

INTRODUÇÃO

Nos pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) sob ventilação mecânica invasiva (VMI), o biofilme do dorso da língua tem sido associado a infecções bacterianas, virais e/ou fúngicas, pois atua como um nicho considerável de patógenos respiratórios (Tulio *et al.*, 2018). Desse modo, possibilitando a translocação bacteriana do meio oral para os pulmões via tubo orotraqueal (Sands *et al.*, 2017), causando infecções sistêmicas graves como a Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) (Song *et al.*, 2023; Otsuji *et al.*, 2019), podendo repercutir nos dias de hospitalização e dias em VMI (Mota *et al.*, 2017; Anvisa 2017).

A VMI é uma das intervenções mais comuns nas UTIs (Santos *et al.*, 2021; Rosário *et al.*, 2017), sendo utilizada, na UTI Pediátrica, como estratégia principal para o manejo de pacientes que necessitam de “manutenção artificial da oxigenação e/ou ventilação nos casos de insuficiência respiratória de diversas etiologias”, sendo realizada através da intubação orotraqueal (Costa *et al.*, 2021).

Nos pacientes em VMI, a colonização da microbiota oral acontece a partir de 48 horas após a intubação (Zhao *et al.*, 2020) e podem estar relacionadas à higienização bucal inadequada (Simões *et al.*, 2020; Tulio *et al.*, 2018). Estudos tem apontado que o déficit de higiene bucal e o tubo orotraqueal dos pacientes em VMI, predispõem ao acúmulo de colônias bacterianas no biofilme oral tornando possível o surgimento da PAV (Sousa *et al.*, 2023) uma vez que a falha no sistema de defesa do organismo dos pacientes em VMI na eliminação desses microrganismos infectantes, favorece a sua multiplicação no biofilme oral (Keane; Martin-Loeches, 2019), de forma que pacientes infectados por esses patógenos multirresistentes tem os piores desfechos com maior mortalidade (Oliveira *et al.*, 2023; Huang *et al.*, 2023; Carvalho *et al.*, 2021).

Por outro lado, em pacientes submetidos à higiene bucal, é possível observar redução no tempo de VMI e tendência à redução da incidência de PAV e do tempo de internação na UTI Adulto (Lacerda Vidal *et al.*, 2017). Enquanto em UTI Pediátrica, foi observado que a eficácia da higiene no controle do biofilme oral pode mitigar a proliferação de bactérias prevenindo o desenvolvimento de infecção respiratória em pacientes sob VMI (Ludovichetti, *et al.*, 2022).

A hipótese deste artigo é que a multiplicação de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas pode variar de acordo com higiene bucal, desfecho hospitalar, dias de hospitalização, dias sob Ventilação Mecânica Invasiva e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica em UTI Pediátrica.

Diante de poucas pesquisas conduzidas a respeito de quantificação relativa de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas em Unidade de Terapia Intensiva, foi proposta a realização deste estudo com o objetivo de investigar se existe associação entre quantificação relativa de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas em UTI, higiene bucal, desfecho hospitalar, dias de hospitalização, dias sob Ventilação Mecânica Invasiva e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento do estudo e Tipo de amostra

Trata-se de um estudo longitudinal de curto prazo realizado de março a dezembro do ano de 2019, com amostra de conveniência na Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica (UTIP) do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - Unidade Materno Infantil (HUUFMA-UMI), São Luís, Maranhão, Brasil.

Seleção da amostra

Foram incluídas crianças de ambos os sexos, com idade de 1 a 144 meses que estavam em ventilação mecânica invasiva (VMI) e que ao darem entrada na UTIP foram intubados. Os critérios de exclusão adotados foram: pacientes com episódio prévio de aspiração do conteúdo gástrico, com doença pulmonar obstrutiva crônica, portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida, com pneumonia comunitária e transplantados de órgãos. Também foram excluídos os participantes que tiveram alta ou óbito, em período inferior a 48 horas após a intubação, bem como os casos não autorizados pela equipe médica devido a debilidade do paciente.

Desse modo, do total dos 217 pacientes internados durante o período da coleta do biofilme lingual (março a dezembro de 2019) na UTI Pediátrica do HUUFMA-UMI, foi obtida a amostra final de 24 crianças, todas em VMI.

Dados de estudo

O tipo de dentição (ausente, decídua, mista e permanente), frequência de alterações orais (cárie dental; alterações periodontais; úlcera oral) e higiene oral (satisfatória= ausência de biofilme lingual visível; insatisfatória= presença de biofilme lingual visível) foram obtidos durante o exame clínico no tempo 1 (T1) por serem dados primários. Dados secundários foram obtidos nos prontuários, a especificar: idade (1 a 99 meses; 100 a 144 meses), sexo (feminino; masculino), tempo de internação (6 a 20 dias;

21 a 40 dias; 41 a 69 dias), tempo de Ventilação Mecânica Invasiva (2 a 10 dias; 11 a 20 dias; 21 a 35 dias) e desfecho do período de internação (alta; óbito).

Coleta de biofilme lingual

O biofilme foi coletado (de março a dezembro de 2019) do dorso da língua das crianças em VMI em dois momentos: no momento da intubação (T1) e 48 horas depois da primeira coleta (T2). Foi utilizado swab estéril sendo este friccionado no dorso da língua de cada paciente e, logo em seguida, foi acondicionado em tubo do tipo Falcon de 15ml estéril contendo 3mL de solução TNE [17 mM Tris/HCl (pH 8.0), 50 mM NaCl e 7 mM EDTA] diluídos em etanol 66% (Aidar & Line 2007). A primeira coleta do biofilme lingual ocorreu no momento da intubação, antes da execução do Protocolo de Higiene Bucal adotado na UMI – HUUFMA, e a segunda coleta do biofilme (48 horas depois da primeira). Foram obtidas 48 amostras de biofilme lingual que ficaram armazenadas em freezer -20° até a extração do DNA bacteriano do material biológico coletado.

Higiene Bucal dos participantes

Os participantes foram inseridos na rotina de cuidados por meio do Protocolo de Higiene Bucal (adotado na UMI – HUUFMA) definido pelo Departamento de Odontologia da Associação de Medicina Intensiva Brasileira (AMIB) em 2011 (Amib 2014). Foi respeitada a rotina do Hospital na qual a equipe de técnicos de enfermagem treinadas e sob a supervisão do cirurgião dentista realizam três vezes ao dia a higiene oral dos paciente em VMI, utilizando solução aquosa de digluconato de clorexidina à 0,12%, com o auxílio de espátula de madeira (abaixador de língua) e compressas de gaze.

As etapas iniciais (não laboratoriais) da pesquisa estão ilustradas na **Figura 1**.

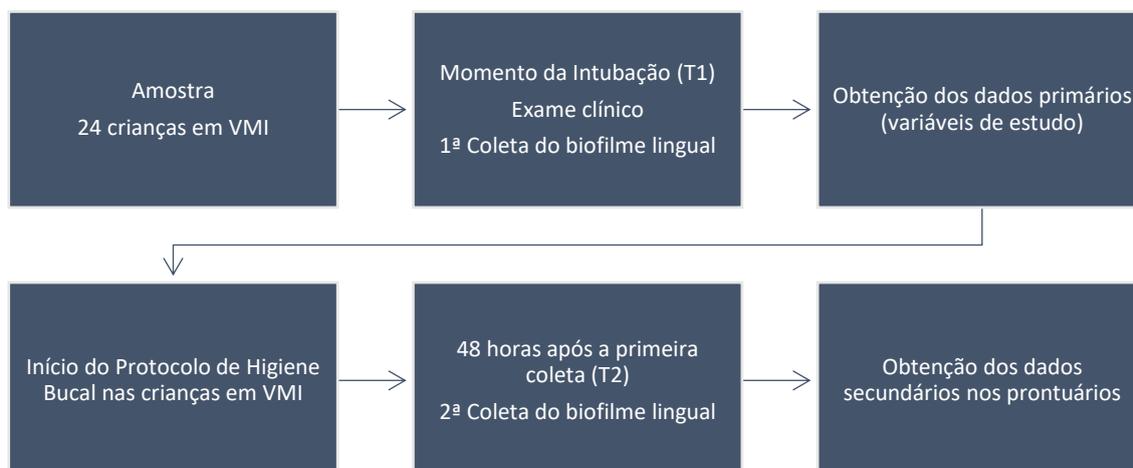


Figura 1. Fluxograma das etapas iniciais da pesquisa.

Extração do DNA das amostras coletadas nos dois momentos (T1 e T2)

A extração de DNA foi realizada como descrito pelo manual de uso do PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), seguindo as instruções do fabricante. O DNA extraído foi submetido a uma dosagem no espectrofotômetro Nanodrop Lite (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) para avaliação da concentração e integridade do DNA. Todo o material ficou congelado em freezer -20°.

Deteção e Quantificação por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (q-PCR)

Foi utilizado um par de primer bacteriano universal 16S (5'-TCCTACGGGAGGCAGCAGT-3' e GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT) para deteção do DNA das bactérias totais presentes nas amostras biológicas. A qPCR (Reação em Cadeia de Polimerase) em Tempo Real permitiu a quantificação relativa (que analisa as alterações da expressão ou abundância gênica bacteriana de um determinado momento em relação a outro) das bactérias detectadas e amplificadas em cada ciclo da reação. (Hortz *et al.*, 2005; Zucol *et al.*, 2006). Foram utilizadas placas de 48 poços com 20 µL de uma solução contendo 10 µL do reagente Syber Green PCR Master Mix (corante

responsável por ligações altamente específica ao DNA dupla-fita, para detectar o produto da PCR conforme ele se acumula durante os ciclos da reação) (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 5 μ L do primer 16S (10 pmol) e 5 μ L de DNA da amostra. Em seguida, a placa foi inserida no equipamento StepOne (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) onde ocorreram os ciclos da reação. O ciclo consistiu em uma desnaturação inicial a 95°C por 3 min, seguido por 45 ciclos de desnaturação a 94°C por 15s, anelamento a 54°C por 15s e extensão a 72°C por 30s. Os resultados foram analisados com base no método de quantificação dos dados da qPCR, o método Ct (threshold cycle), que é uma curva que indica o número do ciclo fracionário em que a quantidade de alvo amplificado atinge um limiar fixo (Hortz et al., 2005). Os níveis de Ct são inversamente proporcionais à quantidade de ácido nucleico alvo na amostra (ou seja, quanto mais baixo o nível Ct, maior é a quantidade de ácido nucleico/menor quantidade de bactérias). O Δ Ct (delta Ct) consiste na diferença de expressão entre o alvo e o controle da amostra (Média CtT2 – Média CtT1), sendo que o Δ Ct positivo indica menos bactérias e o Δ Ct negativo, maior quantidade de bactérias. $\Delta\Delta$ Ct (delta delta Ct) é a diferença entre Δ CtT2 e Δ CtT1, resultando na variação quantitativa das bactérias de cada amostra (Livak & Schmittgen 2001). Todas as amostras do material biológico foram processadas em triplicata.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os recursos do software GraphPad Prism versão 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Inicialmente, a estatística descritiva utilizou medidas de frequência absoluta, relativa, média e desvio-padrão (\pm dp). A normalidade da distribuição amostral foi aferida através do teste Shapiro–Wilk e as variáveis numéricas foram submetidas a esse teste, seguido do teste T pareado para a análise comparativa entre os tempos de coleta do biofilme (T1 e T2) e teste T independente para a análise comparativa do biofilme no mesmo tempo entre as categorias de indicadores hospitalares (presença de PAV, dias de hospitalização e dias em VMI).

Para analisar a direção da relação (direta ou inversa) entre Δ Ct, dias de hospitalização e dias em VMI, foi calculado o coeficiente de correlação linear de Pearson. Modelos de regressão linear múltipla foram utilizados para estimar o efeito do Ct T2 e

ΔC_t , ajustado para idade, sobre as variáveis dias de hospitalização e dias em VM. O nível de significância a 5% foi adotado para todos os testes.

Considerações éticas

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão - HUUFMA (CAAE: 65013316.7.0000.5086). Os pais ou responsáveis legais das crianças envolvidas foram informados do caráter do estudo e assinaram a um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” para permitir a participação dos seus filhos na pesquisa.

RESULTADOS

A **Tabela 1** apresenta a distribuição das variáveis de caracterização das amostras. A maior parte das crianças (83,3%) tinham a idade entre 1 a 99 meses, 58,3% eram do sexo masculino e 41,7% do sexo feminino. 45,8% ficaram internadas de 6 a 20 dias, 45,8% de 21 a 40 dias e apenas 8,4% de 41 a 69 dias. 50% das crianças permaneceram em VMI no período de 2 a 10 dias, 29,2% de 11 a 20 dias e 20,8% de 21 a 35 dias. 37,5% dos pacientes apresentaram dentes ausentes e 54,1% dos pacientes apresentaram higiene oral insatisfatória. Do total da amostra 15 receberam alta e 9 evoluíram a óbito sendo 1 deles com PAV.

Tabela 1- Distribuição das variáveis sociodemográficos, tempo de hospitalização, tempo de ventilação mecânica, avaliação bucal e desfecho clínico na amostra de crianças sob VMI incluídas no estudo.

Variáveis	N	%
Idade		
De 1 a 99 meses	20	(83,3)
De 100 a 144 meses	4	(16,7)
Sexo		
Masculino	14	(58,3)
Feminino	10	(41,7)
Tempo de hospitalização (dias)		
De 6 a 20 dias	11	(45,8)
De 21 a 40 dias	11	(45,8)
De 41 a 69 dias	2	(8,4)
Tempo em ventilação mecânica invasiva (dias)		
De 2 a 10 dias	12	(50,0)

De 11 a 20 dias	7	(29,2)
De 21 a 35 dias	5	(20,8)
Tipo de dentição		
Ausente	9	(37,5)
Decídua	7	(29,2)
Mista	7	(29,2)
Permanente	1	(4,1)
Frequência de alterações orais¹		
Cárie dental	4	(16,7)
Alterações periodontais	2	(8,4)
Úlcera oral	2	(8,4)
Higiene oral		
Satisfatória	11	(45,8)
Insatisfatória	13	(54,1)
Desfecho do período de internação		
Alta	15	(62,5)
Óbito	9	(37,5)

n = frequência absoluta. % = frequência relativa. ¹percentual em relação ao total da amostra.

No biofilme coletado e analisado foi detectado que a média de Ct (inversamente proporcional, ou seja, quanto mais baixo o nível Ct, maior é a quantidade de ácido nucleico/menor quantidade de bactérias, e vice-versa) para quantificação de bactérias foi menor ($25,15 \pm 6,17$) no momento T1 enquanto em T2 a média foi maior ($27,23 \pm 5,61$) (Teste t-pareado, $p = 0,0394$), revelando que houve significativa diminuição na quantificação de patógenos do biofilme lingual (maior Ct = menor quantidade de bactérias) após a execução do protocolo de Higiene Bucal, utilizando solução aquosa de digluconato de clorexidina à 0,12%, com o auxílio de espátula de madeira (abaixador de língua) e compressas de gaze (**Figura 2**).

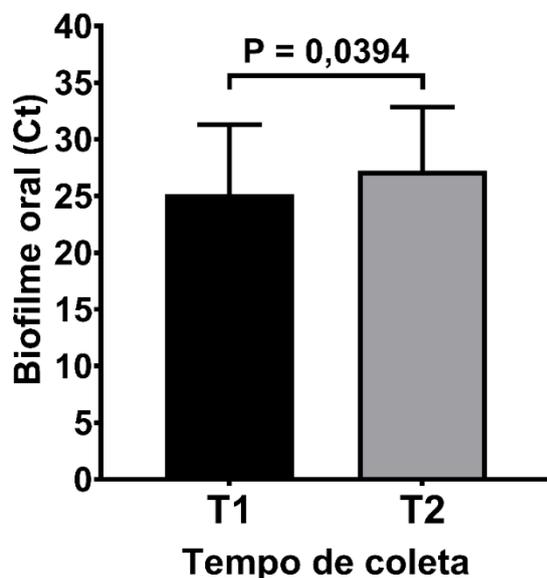
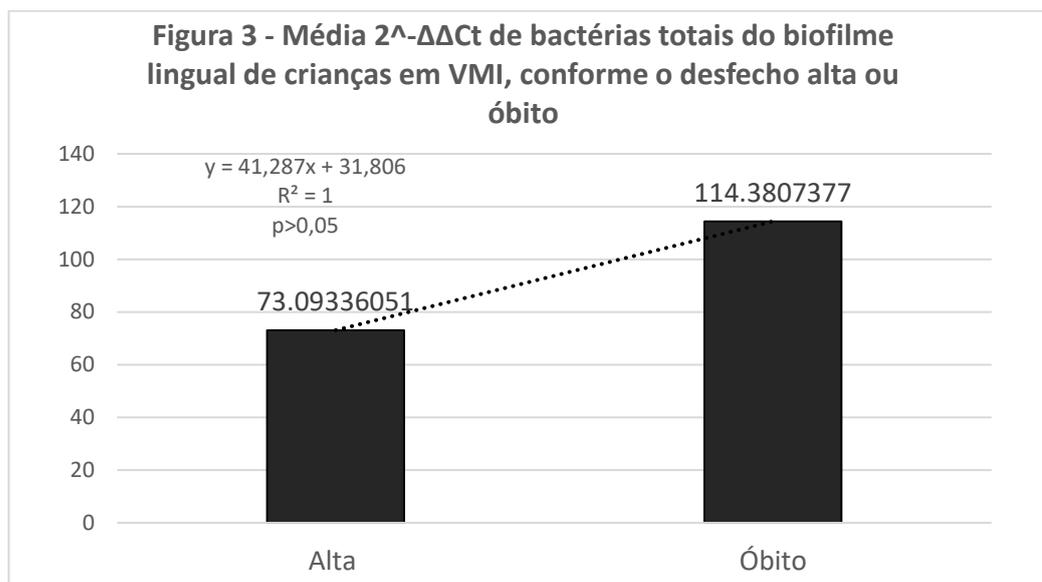


Figura 2. Comparação do biofilme lingual (em Ct) entre os tempos de coleta na amostra de criança sob VMI. T1 = no momento da intubação. T2 = 48 horas depois da primeira coleta.

A **Figura 3** apresenta média da quantidade de bactérias totais no biofilme lingual da amostra total do estudo, dividida de acordo com o desfecho da internação hospitalar (alta e óbito), por meio da quantificação relativa através do método $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct). Observa-se menor expressão relativa de bactérias totais nas crianças que tiveram alta (73.093) que aquelas que vieram a óbito (114.380), revelando tendência destas últimas apresentarem maior colonização de bactérias totais no biofilme lingual, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$, Teste de Mann-Whitney).



Os resultados mostraram correlação negativa (inversa) entre ΔCt e quantidade de dias de hospitalização ($r = -0,279$; $P = 0,185$), porém sem diferença estatística. Bem como diferença estatística na correlação negativa entre ΔCt e quantidade de dias em VMI ($r = -0,422$ e $p = 0,040$), com magnitude moderada e coeficiente de determinação (r^2) de 0,178, revelando que a maior quantidade dos participante (ΔCt positivo=menos bactérias) com maior controle do biofilme lingual ficaram menos tempo em VMI, com variância compartilhada de 17,8% (**Figura 4**).

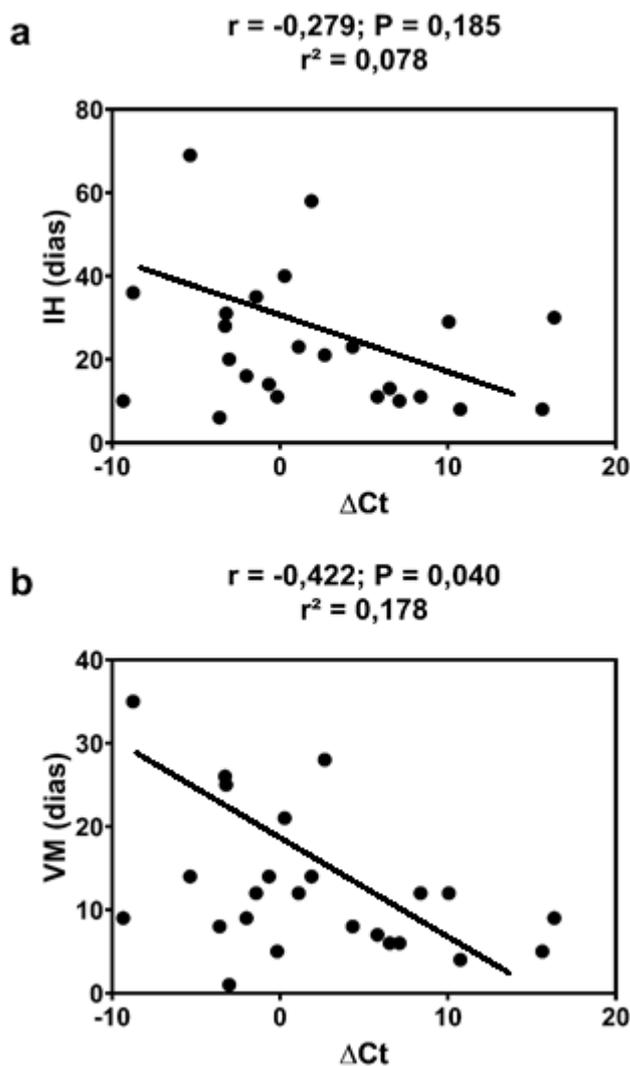


Figura 4. Análise de correlação linear de Pearson entre ΔCt e tempo de hospitalização (a) e tempo em ventilação mecânica (b). IH = internação hospitalar. VMI = ventilação mecânica invasiva.

A análise de regressão múltipla foi realizada para estimar o efeito do ΔCt , ajustada para idade, sobre dias de hospitalização e dias em VMI. Não houve diferença significativa entre ΔCt e dias de hospitalização e a análise ajustada para a idade mostrou medida estatística limítrofe (coeficiente = -0,41, $P = 0,053$) para a relação entre ΔCt e dias em VMI, indicando que não houve evidência suficientemente forte para provar a associação (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de regressão das medidas do biofilme em ΔCt ajustados para idade da criança sobre dias de hospitalização e dias em VMI.

Fatores	Coeficiente padronizado	IC 95%		P
		Limite inferior	Limite superior	
Dias de hospitalização				
ΔCt	-0,25	-0,69	0,18	0,245
Dias em VMI				
ΔCt	-0,41	-0,83	0,01	0,053

IC 95% = intervalo de confiança a 95%.

DISCUSSÃO

Os achados principais deste estudo sugerem que o Protocolo de Higiene Bucal adotado reduziu a quantidade do biofilme lingual das crianças que estavam em VMI no período de 48 horas após a intubação. Destaca-se que das 24 crianças internadas na UTI Pediátrica, 91,6% ficaram internadas de 6 a 40 dias e 79,2% permaneceram em VMI de 2 a 20 dias período em que todas as crianças permaneceram sob cuidados de higiene bucal. Este período de hospitalização corrobora com outros estudos em que a média de permanência dos pacientes na UTI foi de 11 dias com tempo máximo de 28 dias (Tulio *et al.*, 2018) e com maior frequência de tempo de ventilação mecânica acima de 15 dias (Nóbrega *et al.*, 2021).

Estudos que afirmam que a quantidade de biofilme em pacientes de UTIs pode aumentar com o tempo de internação, ocorrendo também a proliferação de patógenos respiratórios no biofilme lingual (Tulio *et al.*, 2018), os quais ficam mais difíceis de serem debelados por estarem protegidos pelo próprio biofilme, o que os torna mais resistentes a antibióticos (Baidya *et al.*, 2021), podendo levar ao surgimento de infecções respiratórias como a PAV (Santos *et al.*, 2022). No entanto, na presente pesquisa, no biofilme coletado e analisado, foi detectado que a média Ct foi menor ($25,15 \pm 6,17$) no momento T1 enquanto em T2 a média foi maior ($27,23 \pm 5,61$) revelando que houve significativa diminuição na quantificação dos patógenos do biofilme lingual (maior Ct = menor quantidade de bactérias) uma vez que foi executado o Protocolo de Higiene Bucal, utilizando solução aquosa de digluconato de clorexidina à 0,12%, com o auxílio de espátula de madeira (abaixador de língua) e compressas de gaze.

Os resultados desta pesquisa respalda que a eficácia do pacote de cuidados de Higiene Bucal em UTI Pediátrica na prevenção de infecções respiratórias utilizando-se o digluconato de clorexidina 0,12% (de Neef *et al.*, 2019), bem como no controle do biofilme sendo considerado padrão ouro na limpeza bucal por se tratar de um antisséptico com amplo espectro (Barros, 2019; Melo *et al.*, 2019). A descontaminação da cavidade oral dos pacientes em UTI após a adoção do Protocolo de Higiene Bucal, tem sido a chave para a redução da colonização pulmonar por patógenos provenientes do biofilme lingual e, consequentemente, redução da incidência de PAV (Soares *et al.*, 2021). Por outro lado,

outras pesquisas realizadas em hospitais de cuidados intensivos têm recomendado apenas remoção mecânica do biofilme oral em adultos, crianças, e recém-nascidos, mas sem a clorexidina (Klompas *et al.*, 2022; Karakaya *et al.*, 2022).

Com relação à média da quantidade de bactérias totais no biofilme lingual da amostra total do estudo, dividida de acordo com o desfecho da internação hospitalar (alta e óbito), por meio da quantificação relativa através do método $\Delta\Delta Ct$ (delta delta Ct), observa-se menor expressão relativa de bactérias totais nas crianças que tiveram alta (73.093) que aquelas que vieram a óbito (114.380), revelando tendência destas últimas apresentarem maior colonização de bactérias totais no biofilme lingual, apesar de não haver diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$, Teste de Mann-Whitney).

O biofilme do dorso de língua de pacientes em UTI pode representar um nicho considerável de patógenos respiratórios potenciais, uma vez que microorganismos gran-negativos relacionados à PAV podem ser isolados já no primeiro dia de internação (Tulio *et al.*, 2018) resultando em internações hospitalares mais longas e aumento da mortalidade com taxa de 15% para mortalidade por PAV (Baydia *et al.*, 2021; Benetti, *et al.*, 2020). Dessa forma, o acúmulo do biofilme lingual favorece a colonização de patógenos respiratórios identificados como causadores de PAV em pacientes intubados (Mileó, 2019) levando inclusive ao aumento da prevalência de mortes infantis em todo o mundo em UTI Pediátrica (Nair *et al.*, 2021).

No presente estudo, os resultados mostraram correlação negativa (inversa) entre ΔCt e quantidade de dias de hospitalização ($r = -0,279$; $P = 0,185$), porém sem diferença estatística. A correlação negativa entre ΔCt e quantidade de dias de VMI, mostrou diferença estatística ($r = -0,422$ e $p = 0,040$), com magnitude moderada e coeficiente de determinação (r^2) de 0,178, revelando que os participante com maior controle do biofilme lingual (ΔCt positivo=menos bactérias) ficaram menos tempo em VMI, com variância compartilhada de 17,8%. Desse modo, esses pacientes são mais beneficiados quando realizado o Protocolo de Higiene Bucal.

A redução significativa no tempo de VMI e tendência à redução da incidência de PAV e do tempo de internação na UTI, tem sido observado em estudos nos quais os pacientes são submetidos à higiene bucal com controle do biofilme oral, embora sem

significância estatística (Lacerda Vidal *et al.* 2017). A literatura vem mostrando a importância de um bom conjunto de cuidados orais para mitigar a proliferação de bactérias na cavidade oral, especialmente em crianças, e para e prevenir o desenvolvimento de infecção respiratória em pacientes sob VMI em UTI (Ludovichetti,*et al.*, 2022) levando a menos tempo de intubação (Sousa *et al.*, 2023).

A análise de regressão múltipla foi realizada para estimar o efeito do ΔCt , ajustada para idade, sobre dias de hospitalização e dias em VMI. Não houve diferença significativa entre ΔCt e dias de hospitalização e a análise ajustada para a idade mostrou medida estatística limítrofe (coeficiente = -0,41, P = 0,053) para a relação entre ΔCt e dias em VMI, indicando que não houve evidência suficientemente forte para provar a associação

No presente estudo foram realizadas duas coletas do biofilme lingual em um único grupo de estudo, A primeira coleta ocorreu no momento da intubação antes da execução do Protocolo de Higiene Bucal. Na segunda coleta do biofilme (48 horas depois da primeira), os participantes já estavam inseridos na rotina de cuidados por meio do Protocolo de Higiene Bucal adotado na UMI- HUUFMA. Foi possível ainda verificar o desfecho clínico dos participantes (alta, óbito) bem como foram registrados presença de PAV, dias de internação e em VMI.

O ponto forte deste estudo está na realização da técnica PCR que oferece um benefício importante, uma vez que permite a quantificação relativa (que analisa as alterações da expressão ou abundância gênica bacteriana de um determinado momento em relação a outro) de qualquer tipo de DNA bacteriano presente numa amostra (Hortz *et al.*, 2005; Zucol *et al.*, 2006). Além disso, este estudo utiliza o gene 16S rRNA como foi relatado na maioria dos ensaios para detecção do DNA das bactérias totais presentes nas amostras biológicas (Harris & Hartley 2003, Klaschik *et al.*, 2002).

Pesquisas que utilizam resultados da cultura podem estar disponíveis apenas após 24 a 72 horas, além de apresentar resultados falso negativos ou bactérias resistentes à cultura (Drancourt *et al.*, 2000; Wilson *et al.*, 1990), enquanto a sequência gerada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a quantificação relativa da bactéria por PCR universal, aumentando o impacto nos ensaios microbiológicos, tal como é feito neste presente estudo. Por conseguinte, esta investigação traz contribuições para os cuidados de saúde, salientando a importância do desenvolvimento e implementação de um

Protocolo de Higiene Bucal em uma UTI Pediátrica a fim de reduzir a quantificação relativa de bactérias do biofilme lingual de crianças intubadas e reduzir dias em ventilação mecânica invasiva.

CONCLUSÃO

A execução de um Protocolo de Higiene Bucal mostrou ser um instrumento eficaz na diminuição da quantificação de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas em Unidade de Terapia Intensiva, com menor quantificação relativa de bactérias totais no biofilme lingual das crianças que tiveram alta e tendência, das que foram a óbito, apresentarem maior colonização de bactérias totais neste biofilme.

Os participantes com maior controle do biofilme lingual, (ΔCt positivo=menos bactérias), ficaram menos tempo em Ventilação Mecânica Invasiva. Desse modo, esses pacientes são mais beneficiados quando realizado o Protocolo de Higiene Bucal. Porém no presente estudo, não foi possível observar forte associação com dias de hospitalização.

REFERÊNCIAS

- Tulio KSC, Stramandinoli-Zanicotti RT, Dirschnabel AJ, Schussel JL, Wasilewski JHS, Krelling A, Beltrame, OC, Martins, CRW, Sassi, LM. Changes in the oral microbiota profile during ICU stay: colonization by potential respiratory pathogens. *Arch Health Invest.* (2018);7(9):351-357. DOI: <https://doi.org/10.21270/archi.v7i9.3009>
- Sands KM, Wilson MJ, Lewis MAO, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, Barnes RA, Williams DW. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways, and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *J Crit Care.* 2017 Feb;37:30-37. doi: 10.1016/j.jcrc.2016.07.019. Epub 2016 Aug 12. PMID: 27621110.
- Song Y, Kim MS, Chung J, Na HS. Simultaneous Analysis of Bacterial and Fungal Communities in Oral Samples from Intubated Patients in Intensive Care Unit. *Diagnostics (Basel).* 2023 May 18;13(10):1784. doi: 10.3390/diagnostics13101784. PMID: 37238268; PMCID: PMC10217707.
- Otsuji K, Fukuda K, Ogawa M, Fujino Y, Kamochi M, Saito M. Dynamics of microbiota during mechanical ventilation in aspiration pneumonia. *BMC Pulm Med.* 2019 Dec 23;19(1):260. doi: 10.1186/s12890-019-1021-5. PMID: 31870355; PMCID: PMC6929358.
- Mota EC, Oliveira SP, Silveira BRM, Silva PLN, Oliveira AC. Incidence of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit. *Medicine (Ribeirão Preto)* 2017; 50(1):39-46. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v50i1p39-46>
- National Health Surveillance Agency (2017) Infection prevention measures related to health care. Brasília: Anvisa; BR.
- Santos LAS, Martinez BP, Ferreira MB, Silva FMV, Pixitelli QF, Correia HF. Autonomy in ventilatory procedures by physiotherapists working in the intensive care in the state of Bahia: a cross-sectional study. *J Physiother Res.* 2021;11(4):791-797. <http://dx.doi.org/10.17267/2238-2704rpf.v11i4.4167>
- Rosario IF, Callegari MR, Souza AC de, Tropiano LMCC, Fernandes M. Preditores de desmame ventilatório em pediatria. *Cad. Pós-Grad. Distúrb. Desenvol.* [Internet]. 2017 [citado 2023-11-02];17(2):32-42. Disponível em: http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S15190307201700020000

4&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 1519-

0307. <http://dx.doi.org/10.5935/cadernosdisturbios.v17n2p32-42>.

Costa GS, Lima DB, Torres RLN, Manso MLC, Santos OC dos; Silva JÁ da, Silva MMM da, Oliveira DAL, Medeiros RRS. Nursing care in preventing pneumonia associated with mechanical ventilation. *Ciência Plural*. 2021;7(3):272-289. DOI: 10.21680/2446-7286.2021v7n3ID22301.

Zhao T, Wu X, Zhang Q, Li C, Worthington HV, Hua F. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Dec 24;12(12):CD008367. doi: 10.1002/14651858.CD008367.pub4. PMID: 33368159; PMCID: PMC8111488.

Simões TMS, Fernandes Neto J de A, Ferreira ACD, Sousa JA de, Medeiros CLSG de, Catão MHC de V. Control of oral biofilm and its relationship with the reduction of respiratory infections in ICU patients: a review of clinical trials. *RSD [Internet]*. 2020Oct.21 [cited 2023Nov.2];9(10):e8339108594. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8594> DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8594>

Souza DE de, Fischer TK, Santos CT dos. A microbiota da cavidade oral e a relação com a pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes de UTI. *SAÚDE [Internet]*. 13º de abril de 2023 [citado 2º de novembro de 2023];16(25):48-5. Disponível em: <https://www.revistasuninter.com/revistasauade/index.php/saudeDesenvolvimento/article/view/1316>

Keane S, Martin-Loeches I. Host-pathogen interaction during mechanical ventilation: systemic or compartmentalized response? *Crit Care*. 2019 Jun 14;23(Suppl 1):134. doi: 10.1186/s13054-019-2410-0. PMID: 31200727; PMCID: PMC6570626.

Oliveira JDS, Cardoso FM. Early mobilization in patients undergoing invasive mechanical ventilation (IMV) for functional recovery. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO* 2023;20(43); p. 213. DOI: 10.18677/EnciBio_2023A18

Huang W, Wei X, Xu G, Zhang X, Wang X. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in critically ill children: Prevalence, risk factors, and impact on outcome in a large tertiary pediatric hospital of China. *Front Public Health*. 2023 Feb

9;11:1088262. doi: 10.3389/fpubh.2023.1088262. PMID: 36844819; PMCID: PMC9948009.

Carvalho JJV de, Boaventura FG, Silva A de CR da, Ximenes RL, Rodrigues LKC, Nunes DA de A, Souza VKG de. Multiresistant bacteria and their impacts on public health: A social responsibility. RSD [Internet]. 2021 Jun.10 [cited 2023 Nov.2];10(6):e58810616303. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16303DOI:https://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.16303>

Lacerda Vidal CF, Vidal AK, Monteiro JG Jr, Cavalcanti A, Henriques APC, Oliveira M, Godoy M, Coutinho M, Sobral PD, Vilela CÂ, Gomes B, Leandro MA, Montarroyos U, Ximenes RA, Lacerda HR. Impact of oral hygiene involving toothbrushing versus chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia: a randomized study. BMC Infect Dis. 2017 Jan 31;17(1):112. doi: 10.1186/s12879-017-2188-0. Erratum in: BMC Infect Dis. 2017 Feb 27;17 (1):173. PMID: 28143414; PMCID: PMC5286780.

Ludovichetti FS, Zuccon A, Positello P, Zerman N, Gracco A, Stellini E, Mazzoleni S. Preventive oral hygiene and ventilator-associated pneumonia in paediatric intensive care unit. Eur J Paediatr Dent. 2022 Dec;23(4):298-302. doi: 10.23804/ejpd.2022.23.04.09. PMID: 36511909.

Aidar M, Line SR. A simple and cost-effective protocol for DNA isolation from buccal epithelial cells. Braz Dent J. 2007;18(2):148-52. doi: 10.1590/s0103-64402007000200012. PMID: 17982556.

Amib. Brazilian intensive care medicine association- [Internet]. 2014 [cited 2023 Nov. 2] Horz HP, Vianna ME, Gomes BP, Conrads G. Evaluation of universal probes and primer sets for assessing total bacterial load in clinical samples: general implications and practical use in endodontic antimicrobial therapy. J Clin Microbiol. 2005 Oct;43(10):5332-7. doi: 10.1128/JCM.43.10.5332-5337.2005. PMID: 16208011; PMCID: PMC1248440.

Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, Nadal D. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by

sequencing for species identification. *J Clin Microbiol.* 2006 Aug;44(8):2750-9. doi: 10.1128/JCM.00112-06. PMID: 16891488; PMCID: PMC1594602.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262. PMID: 11846609.

Nóbrega LM, Vasconcelos JM, Morais JL, Araújo CC, Ramalho Neto JM, Leite AC. Pneumonia associada à ventilação mecânica em pacientes graves de uma unidade de terapia intensiva. *Enferm Foco.* 2021;12(4):746-52. DOI: <https://doi.org/10.21675/2357-707X.2021.v12.n4.4525>

Baidya S, Sharma S, Mishra SK, Kattel HP, Parajuli K, Sherchand JB. Biofilm Formation by Pathogens Causing Ventilator-Associated Pneumonia at Intensive Care Units in a Tertiary Care Hospital: An Armor for Refuge. *Biomed Res Int.* 2021 May 28;2021:8817700. doi: 10.1155/2021/8817700. PMID: 34136573; PMCID: PMC8179767.

Santos MS, Santos W da S, Santana T dos S, Santana VD. Risk factors for ventilator-associated pneumonia: Scope review. *RSD [Internet].* 2022Apr.9 [cited 2023Nov.2];11(5):e33111528126. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/28126> DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i5.28126>.

de Neef M, Bakker L, Dijkstra S, Raymakers-Janssen P, Vileito A, Ista E. Effectiveness of a Ventilator Care Bundle to Prevent Ventilator-Associated Pneumonia at the PICU: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr Crit Care Med.* 2019 May;20(5):474-480. doi: 10.1097/PCC.0000000000001862. PMID: 31058785.

Barros FRB. Adherence to the ventilator-associated pneumonia prevention *Bundle*. *Rev Cuid [Internet].* 2019, 10(2), e746. Epub Jan 09, 2020. ISSN 2216-0973. <https://doi.org/10.15649/cuidarte.v10i2.746>.

Melo MM, Santiago LMM, Nogueira DL, Vasconcelos M de FP. Ventilator-Associated Pneumonia: the Knowledge of Health Professionals Towards Prevention and Educational Measures. *Rev. Pesqui. (Univ. Fed. Estado Rio J., Online) [Internet].* 21° de janeiro de 2019 [citado 2° de novembro de 2023];11(2):377-82. Disponível em:

<https://seer.unirio.br/cuidadofundamental/article/view/6575>.DOI:<http://dx.doi.org/10.9789/2175-5361.2019.v11i2.377-382>

Soares GS, Almeida HLB, Bittencourt AA, Caires NLM. The impact of dental biofilm and tongue coating on patients admitted to an ICU in Manaus/AM. *Research, Society and Development*, 2021, 10(8), e25010817376, 2021 (CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17376>

Klompas M, Branson R, Cawcutt K, Crist M, Eichenwald EC, Greene LR, Lee G, Maragakis LL, Powell K, Priebe GP, Speck K, Yokoe DS, Berenholtz SM. Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia, ventilator-associated events, and nonventilator hospital-acquired pneumonia in acute-care hospitals: 2022 Update. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2022 Jun;43(6):687-713. doi: 10.1017/ice.2022.88. Epub 2022 May 20. PMID: 35589091.

Karakaya Z, Duyu M, Yersel MN. Oral mucosal mouthwash with chlorhexidine does not reduce the incidence of ventilator-associated pneumonia in critically ill children: A randomised controlled trial. *Aust Crit Care*. 2022 Jul;35(4):336-344. doi: 10.1016/j.aucc.2021.06.011. Epub 2021 Aug 8. PMID: 34376358.

Benetti MB, Weinmann ARM, Jacobi LF, Moraes AB de. Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica: perfil das internações e mortalidade. *Saúde (Sta. Maria) [Internet]*. 20º de abril de 2020 [citado 2º de novembro de 2023];46(1). Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/revistasauade/article/view/40879>DOI: 10.5902/2236583440879

Miléo FC. Avaliação da alteração da microbiota bucal de pacientes internados em unidade de terapia intensiva [dissertação]. Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2019.

Nair NS, Lewis LE, Dhyani VS, Murthy S, Godinho M, Lakiang T, Venkatesh BT. Factors Associated With Neonatal Pneumonia and its Mortality in India: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Indian Pediatr*. 2021 Nov 15;58(11):1059-1061. doi: 10.1007/s13312-021-2374-4. PMID: 34837367; PMCID: PMC8639407.

Harris KA, Hartley JC. Development of broad-range 16S rDNA PCR for use in the routine diagnostic clinical microbiology service. *J Med Microbiol.* 2003 Aug;52(Pt 8):685-691. doi: 10.1099/jmm.0.05213-0. PMID: 12867563.

Klaschik S, Lehmann LE, Raadts A, Book M, Hoeft A, Stuber F. Real-time PCR for detection and differentiation of gram-positive and gram-negative bacteria. *J Clin Microbiol.* 2002 Nov;40(11):4304-7. doi: 10.1128/JCM.40.11.4304-4307.2002. Erratum in: *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2799. PMID: 12409416; PMCID: PMC139680.

Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol.* 2000 Oct;38(10):3623-30. doi: 10.1128/JCM.38.10.3623-3630.2000. PMID: 11015374; PMCID: PMC87447.

Wilson KH, Blichington RB, Greene RC. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 1990 Sep;28(9):1942-6. doi: 10.1128/jcm.28.9.1942-1946.1990. Erratum in: *J Clin Microbiol* 1991 Mar;29(3):666. PMID: 2095137; PMCID: PMC268083.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os achados principais deste estudo sugerem que a presença de patógenos respiratórios no biofilme lingual mostrou associação com óbito de pacientes sob Ventilação Mecânica Invasiva em UTI Pediátrica e que o protocolo de higiene bucal adotado reduziu a quantidade de bactérias do biofilme lingual de crianças intubadas e dias em Ventilação Mecânica Invasiva.

No Capítulo I foi possível observar que a presença de *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme lingual de crianças sob Ventilação Mecânica Invasiva parece mais importante do que a sua quantidade para associação com óbito em UTI Pediátrica.

No Capítulo II, foi possível observar que a execução de um Protocolo de Higiene Bucal mostrou ser um instrumento eficaz na diminuição da quantificação de bactérias totais do biofilme lingual de crianças intubadas em Unidade de Terapia Intensiva, com menor quantificação relativa de bactérias totais no biofilme lingual das crianças que tiveram alta e tendência, das que foram a óbito, apresentarem maior colonização de bactérias totais neste biofilme.

Os participantes com maior controle do biofilme lingual, (ΔC_t positivo=menos bactérias), ficaram menos tempo em Ventilação Mecânica Invasiva. Desse modo, esses pacientes são mais beneficiados quando realizado o Protocolo de Higiene Bucal. Porém no presente estudo, não foi possível observar forte associação com dias de hospitalização.

REFERÊNCIAS

Tulio KSC, Stramandinoli-Zanicotti RT, Dirschnabel AJ, Schussel JL, Wasilewski JHS, Krelling A, Beltrame, OC, Martins, CRW, Sassi, LM. Changes in the oral microbiota profile during ICU stay: colonization by potential respiratory pathogens. *Arch Health Invest.* 2018;7(9):351-357. DOI: <https://doi.org/10.21270/archi.v7i9.3009>

Sands KM, Wilson MJ, Lewis MAO, Wise MP, Palmer N, Hayes AJ, Barnes RA, Williams DW. Respiratory pathogen colonization of dental plaque, the lower airways and endotracheal tube biofilms during mechanical ventilation. *Journal of Critical Care* 2017; 37:30-37. doi: 10.1016/j.jcrc.2016.07.019. PMID: 27621110.

Song Y, Kim MS, Chung J, Na HS. Simultaneous Analysis of Bacterial and Fungal Communities in Oral Samples from Intubated Patients in Intensive Care Unit. *Diagnostics (Basel).* 2023 May 18;13(10):1784. doi: 10.3390/diagnostics13101784. PMID: 37238268; PMCID: PMC10217707.

Otsuji K, Fukuda K, Ogawa M, Fujino Y, Kamochi M, Saito M. Dynamics of microbiota during mechanical ventilation in aspiration pneumonia. *BMC Pulm Med.* 2019 Dec 23;19(1):260. doi: 10.1186/s12890-019-1021-5. PMID: 31870355; PMCID: PMC6929358.

Mota EC, Oliveira SP, Silveira BRM, Silva PLN, Oliveira AC. Incidence of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit. *Medicine (Ribeirão Preto)* 2017; 50(1):39-46. DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v50i1p39-46>

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BR). Infection prevention measures related to health care. Brasília: Anvisa; 2017.

Oliveira JDS, Cardoso FM. Early m Papazian L, Klompas M, Luyt CE. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med.* 2020 May;46(5):888-906. doi: 10.1007/s00134-020-05980-0. Epub 2020 Mar 10. PMID: 32157357; PMCID: PMC7095206.obilization in patients undergoing invasive mechanical ventilation (IMV) for functional recovery. *Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer – Jandaia-GO* 2023;20(43); p. 213. DOI: 10.18677/EnciBio_2023A18

Costa GS, Lima DB, Torres RLN, Manso MLC, Santos OC dos; Silva JÁ da, Silva MMM da, Oliveira DAL, Medeiros RRS. Nursing care in preventing pneumonia associated with mechanical ventilation. *Ciência Plural*. 2021;7(3):272-289. DOI: 10.21680/2446-7286.2021v7n3ID22301.

Alibrahim O, Rehder KJ, Miller AG, Rotta AT. Mechanical Ventilation and Respiratory Support in the Pediatric Intensive Care Unit. *Pediatr Clin North Am*. 2022 Jun;69(3):587-605. doi: 10.1016/j.pcl.2022.02.004. PMID: 35667763.

Zhao T, Wu X, Zhang Q, Li C, Worthington HV, Hua F. Oral hygiene care for critically ill patients to prevent ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2020 Dec 24;12(12):CD008367. doi: 10.1002/14651858.CD008367.pub4. PMID: 33368159; PMCID: PMC8111488.

Simões TMS, Fernandes Neto J de A, Ferreira ACD, Sousa JA de, Medeiros CLSG de Catão MHC de V. Control of oral biofilm and its relationship with the reduction of respiratory infections in ICU patients: a review of clinical trials. *RSD [Internet]*. 2020 Oct.21 [cited 2023 Nov.2];9(10):e8339108594. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/8594> DOI: <https://doi.org/10.33448/rsd-v9i10.8594>

Lacerda Vidal CF, Vidal AK, Monteiro JG Jr, Cavalcanti A, Henriques APC, Oliveira M, Godoy M, Coutinho M, Sobral PD, Vilela CÂ, Gomes B, Leandro MA, Montarroyos U, Ximenes RA, Lacerda HR. Impact of oral hygiene involving toothbrushing versus chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia: a randomized study. *BMC Infect Dis*. 2017 Jan 31;17(1):112. doi: 10.1186/s12879-017-2188-0. Erratum in: *BMC Infect Dis*. 2017 Feb 27;17(1):173. PMID: 28143414; PMCID: PMC5286780.

Ludovichetti FS, Zuccon A, Positello P, Zerman N, Gracco A, Stellini E, Mazzoleni S. Preventive oral hygiene and ventilator-associated pneumonia in paediatric intensive care unit. *Eur J Paediatr Dent*. 2022 Dec;23(4):298-302. doi: 10.23804/ejpd.2022.23.04.09. PMID: 36511909.

Cordeiro LC; Ribeiro JRV; Amaral AAG; Werneck JT. The importance of implementing an oral hygiene protocol for intubated patients: a literature review. - *International journal of science dentistry | available [Internet]*. 2022;57(1):135-146. <https://periodicos.uff.br/ijosd>

Kohbodi GA, Rajasurya V, Noor A. Ventilator-Associated Pneumonia. 2022 Sep 10. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 29939533.

Jain V, Vashisht R, Yilmaz G, Bhardwaj A. Pneumonia Pathology. 2023 Jul 31. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan–. PMID: 30252372.

Iosifidis E, Pitsava G, Roilides E. Ventilator-associated pneumonia in neonates and children: a systematic analysis of diagnostic methods and prevention. *Future Microbiol.* 2018 Sep;13:1431-1446. doi: 10.2217/fmb-2018-0108. Epub 2018 Sep 26. PMID: 30256161.

Romandini A, Pani A, Schenardi PA, Pattarino GAC, De Giacomo C, Scaglione F. Antibiotic Resistance in Pediatric Infections: Global Emerging Threats, Predicting the Near Future. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Apr 6;10(4):393. doi: 10.3390/antibiotics10040393. PMID: 33917430; PMCID: PMC8067449.

Keane S, Martin-Loeches I. Host-pathogen interaction during mechanical ventilation: systemic or compartmentalized response? *Crit Care*. 2019 Jun 14;23(Suppl 1):134. doi: 10.1186/s13054-019-2410-0. PMID: 31200727; PMCID: PMC6570626.

Huang W, Wei X, Xu G, Zhang X, Wang X. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in critically ill children: Prevalence, risk factors, and impact on outcome in a large tertiary pediatric hospital of China. *Front Public Health*. 2023 Feb 9;11:1088262. doi: 10.3389/fpubh.2023.1088262. PMID: 36844819; PMCID: PMC9948009.

Carvalho JJV de, Boaventura FG, Silva A de CR da, Ximenes RL, Rodrigues LKC, Nunes DA de A, Souza VKG de. Multiresistant bacteria and their impacts on public health: A social responsibility. *RSD [Internet]*. 2021 Jun.10 [cited 2023 Nov.2];10(6):e58810616303. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/16303> DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i6.16303>

Viana ETC, Barbosa VCS, Rangel LS, Moraes JCC. Changes in the oral cavity of patients admitted to the intensive care unit. *Brazilian Journal of Health Review* 2023, 6(6):29139-29154. DOI:10.34119/bjhrv6n6-199

Souza DES, Fischer TK, Santos CT. The relationship between oral microbiota and ventilator-associated pneumonia in intensive care units' patients *Revista Saúde e Desenvolvimento* 2022,16 (25): 48-58.

Souza LCD, Mota VBR, Carvalho AVSZ, Corrêa RGCF, Libério AS, Lopes FF. Association between pathogens from tracheal aspirate and oral biofilm of patients on mechanical ventilation. *Braz. Oral Res* 2017; 31:e38. <https://doi.org/10.1590/1807-3107BOR-2017>.

Chomton M, Brossier D, Sauthier M, Vallières E, Dubois J, Emeriaud G, Jouvet P. Ventilator-Associated Pneumonia and Events in Pediatric Intensive Care: A Single Center Study. *Pediatr Crit Care Med*. 2018 Dec;19(12):1106-1113. doi: 10.1097/PCC.0000000000001720. PMID: 30234676.

Cavalcante ABL, Vendrusculo JP, Tavares LC, , Valente OS , Lima EK, Silva RR, Souza JS, Lima AAM, Posso PNV, Bonfá ALC. Pneumonia associated with mechanical ventilation: consequences and mortality in an intensive therapy unit. *REAS/EJCH* 2020;44;1-9. DOI: <https://doi.org/10.25248/reas.e2385.2020>

Lichtenberg M, Jakobsen TH, Kühn M, Kolpen M, Jensen PØ, Bjarnsholt T. The structure-function relationship of *Pseudomonas aeruginosa* in infections and its influence on the microenvironment. *FEMS Microbiol Rev*. 2022 Sep 2;46(5):fuac018. doi: 10.1093/femsre/fuac018. PMID: 35472245; PMCID: PMC9438473.

Mulcahy LR, Isabella VM, Lewis K. Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* na doença. *Microb Ecol*. Juleiro de 2014;68(1):1-12. [[PubMed](#)] [[artigo gratuito do PMC](#)]

Wilson MG, Pandey S. *Pseudomonas aeruginosa*. [Updated 2023 Aug 8]. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/>

Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci*. 2020 Nov 17;21(22):8671. doi: 10.3390/ijms21228671. PMID: 33212950; PMCID: PMC7698413.

Rosa LN, Castro AP de, Lima WG de, Simião DC, Paiva MC de. Ventilator-associated pneumonia from polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: A systematic review. *RSD [Internet]*. 2021 Oct 21 [cited 2023 Nov 2];10(13):e555101321480. Available from: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/21480>. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21480>

Gima MBS, Côrrea JS, Correa MSO, Neto JGH, Teixeira JP, Marques RB, Andrade MGFS, Azevedo AP. Microbiological characteristics and resistance profile of microorganisms causing hospital infections in an ICU for pediatric patients in a hospital references in Amazon infectology. *Braz. J. Hea. Rev. [Internet]*. 2020 Jul. 20 [cited 2023 Nov. 3];3(4):8663-78. Available from: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BJHR/article/view/13490> DOI: <https://doi.org/10.34119/bjhrv3n4-114>

Halat DH, Moubareck CA. The Intriguing Carbapenemases of *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Genetic Profile, and Global Epidemiology. *Yale J Biol Med*. 2022 Dec 22;95(4):507-515. PMID: 36568831; PMCID: PMC9765337.

Wood SJ, Goldufsky JW, Seu MY, Dorafshar AH, Shafikhani SH. *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxins: Mechanisms of Cytotoxicity and Impact on Inflammatory Responses. *Cells*. 2023 Jan 3;12(1):195. doi: 10.3390/cells12010195. PMID: 36611990; PMCID: PMC9818787.

Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella* Pneumonia. 2023 Jul 20. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. PMID: 30085546.

Dai P, Hu D. The making of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Lab Anal*. 2022 Dec;36(12):e24743. doi: 10.1002/jcla.24743. Epub 2022 Nov 8. PMID: 36347819; PMCID: PMC9757020.

Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallarés R, Domínguez MÁ, Liñares J, Ardanuy C. Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Strains Causing Bloodstream Infections in

Adults. *Microb Drug Resist.* 2018 Sep;24(7):949-957. doi: 10.1089/mdr.2017.0107. Epub 2017 Dec 11. PMID: 29227744.

Hyun M., Noh CI, Ryu SY, Kim HA. Mudança de tendências nas características clínicas e suscetibilidade a antibióticos da bacteremia por *Klebsiella pneumoniae*. *Coreano J. Internal Med* 2018. 33(3),595-603. doi: 10.3904/kjim.2015.257

Falcone M, Bassetti M, Tiseo G, Giordano C, Nencini E, Russo A, Graziano E, Tagliaferri E, Leonildi A, Barnini S, Farcomeni A, Menichetti F. Time to appropriate antibiotic therapy is a predictor of outcome in patients with bloodstream infection caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Crit Care.* 2020 Jan 30;24(1):29. doi: 10.1186/s13054-020-2742-9. PMID: 32000834; PMCID: PMC6993311.

Balkan II, Alkan M, Aygün G, Kuşkucu M, Ankaralı H, Karagöz A, Şen S, Arsu HY, Biçer M, Kaya SY, Karaali R, Mete B, Saltoğlu N, Tabak F. Colistin resistance increases 28-day mortality in bloodstream infections due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Oct;40(10):2161-2170. doi: 10.1007/s10096-020-04124-y. Epub 2021 May 8. PMID: 33963928.

Meng H, Han L, Niu M, Xu L, Xu M, An Q, Lu J. Risk Factors for Mortality and Outcomes in Hematological Malignancy Patients with Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections. *Infect Drug Resist.* 2022 Aug 4;15:4241-4251. doi: 10.2147/IDR.S374904. PMID: 35959146; PMCID: PMC9359710.

Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 2016;80:629–61.

Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report Early implementation. (2016-2017).

Mulani MS, Kamble EE, KumkarSN, TawreMS, PardesiKR. Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Frontiers in microbiology* 2019, 10:539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

Chen Q, Wang M, Han M, Xu L, Zhang H. Molecular basis of *Klebsiella pneumoniae* colonization in host. *Microb Pathog.* 2023 Apr;177:106026. doi: 10.1016/j.micpath.2023.106026. Epub 2023 Feb 10. PMID: 36773942.

Facciolà A, Pellicanò GF, Visalli G, Paolucci IA, Venanzi Rullo E, Ceccarelli M, D'Aleo F, Di Pietro A, Squeri R, Nunnari G, La Fauci V. The role of the hospital environment in the healthcare-associated infections: a general review of the literature. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019 Feb;23(3):1266-1278. doi: 10.26355/eurrev_201902_17020. PMID: 30779096.

Pinheiro CLS, Lima FP, Machado FC, Santos SS, Malheiro ARX, Ataíde LA, Figueiredo ACL. Oral and tracheal microbiota of pediatric and adolescent patients in an intensive care unit. *Spec Care Dentist.* 2021 Sep;41(5):599-606. doi: 10.1111/scd.12602. Epub 2021 May 9. PMID: 33966288.

Prasad, R.; Daly, B.; Manley, G. Effect of daily manual toothbrushing with 0.2% chlorhexidine gel on pneumonia-associated pathogens in adults living with profound neuro-disability. *Access Microbiol*, 1, n. 10, p. e000066, 2019.

de Neef M, Bakker L, Dijkstra S, Raymakers-Janssen P, Vileito A, Ista E. Effectiveness of a Ventilator Care Bundle to Prevent Ventilator-Associated Pneumonia at the PICU: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pediatr Crit Care Med.* 2019 May;20(5):474-480. doi: 10.1097/PCC.0000000000001862. PMID: 31058785.

Barros FRB. Adherence to the ventilator-associated pneumonia prevention bundle. *Rev Cuidarte* 2019; 10(2): e746. <http://dx.doi.org/10.15649/cuidarte.v10i2.746>.

Melo MM, Santiago LMM, Nogueira DL, Vasconcelos M de FP. Ventilator-Associated Pneumonia: the Knowledge of Health Professionals Towards Prevention and Educational Measures. *Rev. Pesqui. (Univ. Fed. Estado Rio J., Online)* [Internet]. 21° de janeiro de 2019 [citado 2° de novembro de 2023];11(2):377-82. Disponível em: <https://seer.unirio.br/cuidadofundamental/article/view/6575>.DOI:<http://dx.doi.org/10.9789/2175-5361.2019.v11i2.377-382>

Lee S, Lighvan NL, McCredie V, Pechlivanoglou P, Krahn M, Quiñonez C, Azarpazhooh A. Chlorhexidine-Related Mortality Rate in Critically Ill Subjects in Intensive Care Units: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Respir Care.* 2019 Mar;64(3):337-349. doi: 10.4187/respcare.06434. PMID: 30850551.

De Cristofano A, Peuchot V, Canepari A, Franco V, Perez A, Eulmesekian P. Implementation of a Ventilator-Associated Pneumonia Prevention Bundle in a Single

PICU. *Pediatr Crit Care Med.* 2016 May;17(5):451-6. doi: 10.1097/PCC.0000000000000714. PMID: 27043995.

Karakaya Z, Duyu M, Yersel MN. Oral mucosal mouthwash with chlorhexidine does not reduce the incidence of ventilator-associated pneumonia in critically ill children: A randomised controlled trial. *Aust Crit Care.* 2022 Jul;35(4):336-344. doi: 10.1016/j.aucc.2021.06.011. Epub 2021 Aug 8. PMID: 34376358.

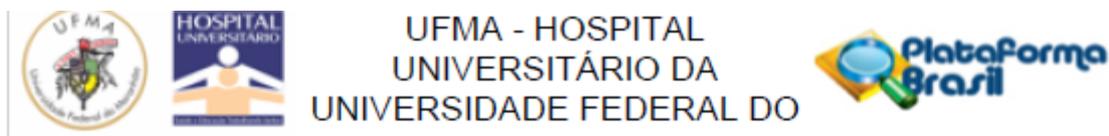
Klompas M, Branson R, Cawcutt K, Crist M, Eichenwald EC, Greene LR, Lee G, Maragakis LL, Powell K, Priebe GP, Speck K, Yokoe DS, Berenholtz SM. Strategies to prevent ventilator-associated pneumonia, ventilator-associated events, and nonventilator hospital-acquired pneumonia in acute-care hospitals: 2022 Update. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2022 Jun;43(6):687-713. doi: 10.1017/ice.2022.88. Epub 2022 May 20. PMID: 35589091.

Diamantino LGS, Monteiro BG, Dantas JBL, Reis SRA, Medrado ARAP. A retrospective study on the oral health of patients in the intensive care unit. *Rev Ciênc Med Biol* 2020, 19(2):287-291. DOI: <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v19i2.36692>

ANEXOS

ANEXO A-

Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DA ODONTOLOGIA NOS INDICADORES HOSPITALARES E NA MICROBIOTA BUCAL DE PACIENTES EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA

Pesquisador: Fernanda Ferreira Lopes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65013316.7.0000.5086

Instituição Proponente: Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão/HU/UFMA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.039.940

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo que tem como objetivo verificar a influência de ações odontológicas nos indicadores hospitalares e na microbiota bucal dos pacientes sob ventilação mecânica (VM) nas Unidades de Terapia (UTIs) Geral e Pediátrica do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão (HUUFMA). A presente pesquisa será realizada nas UTIs Geral e Pediátrica do HUUFMA e será dividida em duas etapas: um estudo observacional analítico retrospectivo e outro estudo prospectivo experimental com duração de um ano. A metodologia será realizada através das seguintes etapas: Etapa 1: Coleta junto à Comissão de Controle e Infecção Hospitalar (CCIH) dos indicadores hospitalares: PAV, VM/dia, pacientes/dia e óbitos no período anterior em que não havia assistência odontológica nas UTIs (UTI Geral - janeiro de 2011 a junho de 2012 e UTI Ped - junho de 2012 a maio de 2013) e no período em que já havia essa assistência (UTI Geral agosto de 2012 a dezembro de 2013 e UTI Ped - junho de 2013 a maio de 2014). Visando comparar as frequências destes indicadores na UTI nos períodos prévios e posteriores à atuação do profissional de Odontologia. Etapa 2: Consiste em estudo prospectivo experimental com duração de um ano em que será realizado novo treinamento da equipe de técnicos de enfermagem das UTIs Geral e Ped do HUUFMA para a realização de um protocolo de higiene bucal com a inclusão da clorexidina



UFMA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 2.039.940

a 0,12% em todos os pacientes internados. Este protocolo será incluído na rotina da UTI sob a supervisão do Cirurgião-Dentista. Este protocolo será incluído na rotina da UTI sob a supervisão do Cirurgião-Dentista. O Cirurgião-Dentista treinará todas as equipes de técnicos de enfermagem das UTIs para a execução do Protocolo de Higiene Bucal (AMIB, 2014). Seleção da Amostra: A amostra da segunda etapa será composta por pacientes internados nas UTI Geral e Ped do HUUFMA que se encontrar em intubação orotraqueal, sendo que essas unidades de saúde atualmente dispõem de 15 e 10 leitos ativos, respectivamente. Considerando o nível de confiança de 95% em uma distribuição homogênea de 80% para a população de 230 pacientes atendidos pela Odontologia na UTI Adulto, chegou-se a um tamanho amostral mínimo de 49 participantes. Será utilizada ficha de coleta de dados com as seguintes informações de cada paciente internado nas UTIs Geral e Ped do HUUFMA: gênero, idade, motivo da internação, doenças sistêmicas, processos patológicos na cavidade bucal, material de higiene bucal utilizado, nível de consciência, condição das vias aéreas, presença de PAV, treinamentos do protocolo de higiene bucal para a equipe de técnicos de enfermagem. Também será colhido o biofilme bucal dos pacientes em intubação orotraqueal para quantificar a presença dos patógenos causadores de PAV *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* no biofilme bucal dos pacientes intubados na sua admissão e 48 horas após a internação e consequente recebimento do protocolo de higiene bucal, tanto para os pacientes da UTI Geral como da UTI PEd. Com os dados coletados será possível determinar a frequência de casos de PAV existentes em um período de tempo (prevalência de período) e a frequência com que surgem novos casos (incidência). Ainda será possível determinar as taxas de VM/dia, pacientes/dia e de óbitos. Ao final da coleta dos dados, será calculado o poder da amostra para estimar o quanto o tamanho amostral foi suficiente para controlar um possível erro do tipo II para os testes de hipótese utilizados em cada objetivo de estudo. Na segunda etapa serão incluídos todos os pacientes que se encontrarem em intubação orotraqueal e não incluídos os pacientes que estiverem respirando em ar ambiente ou com suporte de oxigênio ou em ventilação mecânica não invasiva. Vale ressaltar que os pacientes incluídos estão passando pelo procedimento avaliado neste estudo, durante as rotinas de cuidados da unidade hospitalar. Serão excluídos os pacientes com episódio prévio de aspiração do conteúdo gástrico, pacientes que foram submetidos à cirurgia torácica, com doença pulmonar obstrutiva crônica, portadores do vírus da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (OLIVEIRA et al., 2007), com

Continuação do Parecer: 2.039.940

pneumonia comunitária e transplantados de órgãos. A coleta de dados está prevista para iniciar dia 05 de Junho de 2017. Financiamento Próprio.

Objetivo da Pesquisa:

- Objetivo Primário:

Verificar a influência de ações odontológicas nos indicadores hospitalares e na microbiota bucal dos pacientes sob VM nas UTIs Geral e Pediátrica do HUUFMA.

- Objetivos secundários:

- Mensurar o impacto da ação sistemática em saúde bucal, mediante instituição de um protocolo de higiene bucal;
- Verificar o impacto do protocolo de higiene bucal na incidência de PAV;
- Quantificar a presença dos patógenos causadores de PAV *Acinetobacterbaumannii* e *Pseudomonasaeruginosano* biofilme bucal;
- Associar a quantidade destes patógenos respiratórios causadores de PAV no biofilme bucale no aspirado traqueal; na UTIPed também será comparado com o swab nasal;
- Comparar a incidência de PAV em diferentes períodos do estudo (antes e após a atuação do profissional de Odontologia nessa unidade de saúde);
- Verificar a condição da mucosa bucal dos pacientes adultos e pediátricos em uso da clorexidina a 0,12% na higiene bucal.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Riscos:

O pesquisador relata que "a pesquisa trata do acompanhamento de um serviço que já está inserido na rotina das UTIs Geral e Ped e durante a coleta do material, apesar de o paciente estar intubado, o risco de ocorrer deslocamento do tubo é mínimo, pois a remoção do biofilme será realizada com instrumento flexível (swab). Portanto não haverá vigor suficiente na

Continuação do Parecer: 2.039.940

manobra para que cause deslocamento do tubo".

- Benefícios:

O pesquisador relatou que "como benefícios, tem-se o acompanhamento constante do Cirurgião-Dentista e o monitoramento e tratamento de possíveis alterações que possam ocorrer.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante pois nos últimos anos, estudos sugerem que as bactérias presentes na cavidade bucal, exercem um papel importante na etiologia de outras doenças, incluindo doenças respiratórias, e a literatura tem demonstrado, de maneira clara e vigorosa, a influência da condição bucal na evolução do quadro dos pacientes internados e que o biofilme bucal de pacientes internados em UTI pode servir de reservatório para microrganismos associados com pneumonia nosocomial.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O protocolo apresenta documentos referente aos "Termos de Apresentação Obrigatória": Folha de rosto, Declaração de compromisso em anexar os resultados na plataforma Brasil garantindo o sigilo, Orçamento financeiro detalhado, Cronograma com etapas detalhada, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), Autorização do Gestor responsável do local para a realização da coleta de dados e Projeto de Pesquisa Original na íntegra em Word. Atende à Norma Operacional no 001/2013 (item 3/ 3.3).

O protocolo apresenta ainda as declarações de anuência, declaração de responsabilidade financeira e termo de compromisso com a utilização dos dados resguardando o sigilo e a confidencialidade.

Recomendações:

Após o término da pesquisa o CEP-HUUFMA solicita que se possível os resultados do estudo sejam devolvidos aos participantes da pesquisa ou a instituição que autorizou a coleta de dados de forma anonimizada.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O PROTOCOLO atende aos requisitos fundamentais da Resolução CNS nº 466/12 e suas complementares.



UFMA - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 2.039.940

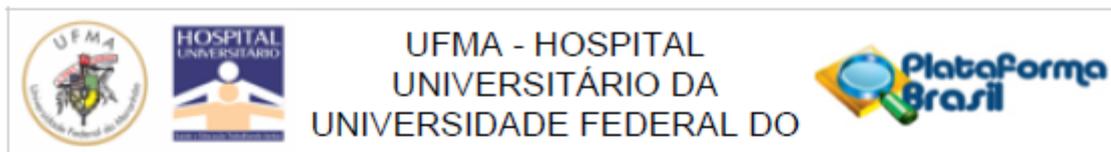
Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa–CEP-HUUFMA, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº.466/2012 e Norma Operacional nº. 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Eventuais modificações ao protocolo devem ser inseridas à plataforma por meio de emendas de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente após a coleta de dados e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_835162.pdf	21/04/2017 12:52:36		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PROJETO_LUANA_abril2017.docx	21/04/2017 12:51:25	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_doutorado_Luana_CEP_abril_2017.docx	21/04/2017 12:50:11	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito
Outros	carta_resposta_CEP_abril2017.docx	21/04/2017 12:46:22	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito
Outros	capa_projeto_doutorado.pdf	21/02/2017 10:58:21	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito
Outros	Termo_Anuencia_CEP.pdf	23/01/2017 09:55:06	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito
Outros	Termo_compromisso_CEP.pdf	23/01/2017 09:54:23	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito
Outros	Declaracao_Responsabilidade_Financieira_CEP.pdf	23/01/2017 09:53:06	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer_comic_verso.pdf	18/12/2016 19:37:26	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer_comic_frente.pdf	18/12/2016 19:37:09	Luana Carneiro Diniz Souza	Aceito



Continuação do Parecer: 2.039.940

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO LUIS, 01 de Maio de 2017

Assinado por:

Dorlene Maria Cardoso de Aquino
(Coordenador)

ANEXO B-

Diretrizes para publicação de trabalhos na Brazilian Oral Research (Artigo 1)



Open Access

Brazilian Oral Research

Publicação de: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO

Área: Ciências Da Saúde

Versão impressa ISSN: 1806-8324 Versão on-line ISSN: 1807-3107

Título anterior: Pesquisa Odontológica Brasileira

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to	Brazilian Oral Research
Manuscript ID	BOR-2024-0123
Title	Quantification of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> in lingual biofilm of intubated children
Authors	MONTEIRO, TANIA VIDAL, Flávia ALMONDES, Camila SILVA, Fábio SOUZA, Luana RODRIGUES, Vandilson LOPES, FERNANDA
Date Submitted	02-Mar-2024

Instruções aos autores

A **Brazilian Oral Research - BOR** (versão online ISSN 1807-3107) é a publicação oficial da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica - SBPqO (Divisão brasileira da *International Association for Dental Research - IADR*). A revista tem classificação A2 Qualis Capes (Odontologia), Fator de Impacto™/2018/2019 1,508 (Institute for Scientific Information - ISI), é revisada por pares (sistema duplo-cego) e tem como missão disseminar e promover o intercâmbio de informações sobre as diversas áreas da pesquisa odontológica e com acesso aberto, modalidade dourada, sem embargo.

A **BOR** aceita submissão dos seguintes tipos de artigos originais e de revisão, nas seguintes tipologias: Pesquisa Original (artigo completo ou *Short Communication*), Revisão Sistemática (e Meta-Análise), além de Cartas ao Editor. Todas as submissões deverão ser exclusivas à BOR.

As revisões críticas de literatura são artigos escritos à convite do editor. A submissão dos manuscritos, e de toda documentação relacionada, deve ser realizada exclusivamente pelo ScholarOne Manuscripts™, através do link de submissão online.

O processo de avaliação do conteúdo científico do manuscrito será iniciado somente após o atendimento dos requisitos descritos nestas Instruções aos Autores. O manuscrito em desacordo com estes requisitos será devolvido ao autor de correspondência para adequações.

Importante: Após ser aceito por seu mérito científico, todo manuscrito deverá ser submetido a uma revisão gramatical e estilística do idioma inglês. Para conhecer as empresas recomendadas, entre em contato com bor@sbpqo.org.br. Os autores deverão encaminhar o texto revisado juntamente com o certificado de revisão fornecido pela empresa de edição escolhida. **Não serão aceitas revisões linguísticas realizadas por empresas que não estejam entre as indicadas pela BOR**

Apresentação do manuscrito

O texto do manuscrito deverá estar redigido em inglês e fornecido em arquivo digital compatível com o programa "Microsoft Word" (em formato DOC, DOCX ou RTF).

Cada uma das figuras (inclusive as que compõem esquemas/compos) deverá ser fornecida em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Fotografias, micrografias e radiografias deverão ser fornecidas em formato TIFF, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais deverão ser fornecidos em formato PDF, em arquivo individual e separado, conforme as recomendações descritas em tópico específico.

Arquivos de vídeo poderão ser submetidos, respeitando as demais especificidades, inclusive o anonimato dos autores (para fins de avaliação) e respeito aos direitos dos pacientes.

Importante: o ScholarOne™ permite que o conjunto dos arquivos somem no máximo 10 MB. No caso de a inclusão do arquivo de vídeo acarretar em tamanho superior, é possível informar o link de acesso ao vídeo. Na reprodução de documentação clínica, o uso de iniciais, nomes e/ou números de registro de pacientes são proibidos. A identificação de pacientes não é permitida. Um termo de consentimento esclarecido, assinado pelo paciente, quanto ao uso de sua imagem deverá ser fornecido pelo(s) autor(es) quando solicitado pela **BOR**. Ao reproduzir no manuscrito algum material previamente publicado (incluindo textos, gráficos, tabelas, figuras ou quaisquer outros materiais), a legislação cabível de Direitos Autorais deverá ser respeitada e a fonte citada.

As seções do manuscrito devem ser apresentadas observando-se as características específicas de cada tipo de manuscrito: folha de rosto (*Title Page*), introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos e referências.

Folha de rosto (*Title Page*; dados obrigatórios)

Indicação da área temática da pesquisa enfocada no manuscrito.

Áreas Temáticas: Anatomia; Biologia Craniofacial; Biologia Pulpar; Bioquímica; Cariologia; Ciências do Comportamento; Cirurgia Bucomaxilo; Controle de Infecção; Dentística; Disfunção Temporomandibular; Estomatologia; Farmacologia; Fisiologia; Imaginologia; Implantodontia - Clínica Cirúrgica; Implantodontia - Clínica Protética; Implantodontia Básica e Biomateriais; Imunologia; Materiais Dentários; Microbiologia; Oclusão; Odontogeriatrics; Odontologia Legal; Odontologia Social; Odontopediatria; Ortodontia; Ortopedia; Patologia Oral; Periodontia; Prótese; Saúde Coletiva; Terapia Endodôntica.

Título informativo e conciso, limitado a um máximo de 110 caracteres incluindo espaços.

Nomes completos e por extenso de todos os autores, incluindo os respectivos e-mails e ORCID.

Recomenda-se aos autores confrontar seus nomes anotados na Folha de Rosto (*Title Page*) com o perfil criado no ScholarOne™, de modo a evitar incompatibilidades. Dados de afiliação institucional/profissional de todos os autores, incluindo universidade (ou outra instituição), faculdade/curso em inglês, departamento em inglês, cidade, estado e país. **Só é aceita uma afiliação por autor**. Verificar se as afiliações foram inseridas corretamente no ScholarOne™.

Resumo: deve ser apresentado na forma de um parágrafo único estruturado (sem subdivisões em seções), contendo objetivo, metodologia, resultados e conclusões. No Sistema, utilizar a ferramenta *Special characters* para caracteres especiais, se aplicável.

Descritores: devem ser fornecidos de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais, escolhidos dentre os descritores cadastrados em <https://meshb.nlm.nih.gov/search> (não serão aceitos sinônimos).

Introdução: deve apresentar o estado da arte do assunto pesquisado, a relevância do estudo e sua relação com outros trabalhos publicados na mesma linha de pesquisa ou área, identificando suas limitações e possíveis vieses. O objetivo do estudo deve ser apresentado concisamente ao final dessa seção.

Metodologia: devem ser fornecidas todas as características do material pertinente ao assunto da pesquisa (ex.: amostras de tecido, sujeitos da pesquisa). Os métodos experimentais, analíticos e estatísticos devem ser descritos de forma concisa, porém suficientemente detalhada para permitir que outros possam repetir o trabalho. Os dados de fabricantes ou fornecedores de produtos, equipamentos, ou softwares devem ser

explicitados na primeira menção feita nesta seção, como segue: nome do fabricante, cidade e país. Os programas de computador e métodos estatísticos também devem ser especificados. A menos que o objetivo do trabalho seja comparar produtos ou sistemas específicos, os nomes comerciais de técnicas, bem como de produtos ou equipamentos científicos ou clínicos só devem ser citados nas seções de "Metodologia" e "Agradecimentos", de acordo com o caso. No restante do manuscrito, inclusive no título, devem ser utilizados os nomes genéricos. Nos manuscritos que envolvam radiografias, microrradiografias ou imagens de MEV, devem ser incluídas as seguintes informações: fonte de radiação, filtros e níveis de kV utilizados. Os manuscritos que relatem estudos em humanos devem incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida eticamente de acordo com a Declaração de Helsinki (*World Medical Association*). O número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Estudos observacionais devem seguir as diretrizes STROBE e o check list deve ser submetido. Ensaios clínicos devem ser relatados de acordo com o protocolo padronizado da *CONSORT Statement*, revisões sistemáticas e meta-análises devem seguir o PRISMA, ou Cochrane.

Ensaio Clínico

Os ensaios clínicos segundo as diretrizes CONSORT. O número de registro do ensaio clínico e o nome do registro da pesquisa serão publicados com o artigo.

Manuscritos que relatem a realização de estudos em animais devem também incluir comprovação de que a pesquisa foi conduzida de maneira ética, e o número de protocolo de aprovação emitido por um Comitê Institucional de Ética deve ser citado. Caso a pesquisa envolva um registro genético, antes da submissão, as novas sequências genéticas devem ser incluídas num banco de dados público, e o número de acesso deve ser fornecido à **BOR**. Os autores poderão utilizar as seguintes bases de dados:

GenBank

EMBL

DDBJ

As submissões de manuscritos que incluam dados de *microarray* devem incluir a informação recomendada pelas diretrizes MIAME (*Minimum Information About a Microarray Experiment*) e/ou descrever, na forma de itens, como os detalhes experimentais foram submetidos a uma das bases de dados publicamente disponíveis, tais como:

ArrayExpress

GEO

Resultados: devem ser apresentados na mesma ordem em que o experimento foi realizado, conforme descrito na seção "Metodologia". Os resultados mais significativos devem ser descritos. Texto, tabelas e figuras não devem ser repetitivos. Os resultados com

significância estatística devem vir acompanhados dos respectivos valores de p.

Tabelas: devem ser numeradas e citadas consecutivamente no texto principal, em algarismos arábicos. As tabelas devem ser submetidas separadamente do texto em formato DOC, DOCX ou XLS (podem estar reunidas em um único arquivo).

Discussão: deve discutir os resultados do estudo em relação à hipótese de trabalho e à literatura pertinente. Deve descrever as semelhanças e as diferenças do estudo em relação aos outros estudos correlatos encontrados na literatura, e fornecer explicações para as possíveis diferenças encontradas. Deve também identificar as limitações do estudo e fazer sugestões para pesquisas futuras.

Conclusões: devem ser apresentadas concisamente e estar estritamente fundamentadas nos resultados obtidos na pesquisa. O detalhamento dos resultados, incluindo valores numéricos etc., não deve ser repetido.

Agradecimentos: as contribuições de colegas (por assistência técnica, comentários críticos etc.) devem ser informadas, e qualquer vinculação de autores com firmas comerciais deve ser revelada. Esta seção deve descrever a(s) fonte(s) de financiamento da pesquisa, incluindo os respectivos números de processo.

Referências: só serão aceitas como referências as publicações em periódicos revisados por pares.

As citações de referências devem ser identificadas no texto por meio de números arábicos sobrescritos. A lista completa de referências deve vir após a seção de "Agradecimentos", e as referências devem ser numeradas e apresentadas de acordo com o Estilo Vancouver, em conformidade com as diretrizes fornecidas pelo *International Committee of Medical Journal Editors*, conforme apresentadas em *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals*. Os títulos de periódicos devem ser abreviados de acordo com o *List of Journals Indexed in Index Medicus*. A correta apresentação das referências é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Grafia de termos científicos: nomes científicos (binômios de nomenclatura microbiológica, zoológica e botânica) devem ser escritos por extenso, bem como os nomes de compostos e elementos químicos, na primeira menção no texto principal.

Unidades de medida: devem ser apresentadas de acordo com o Sistema Internacional de Medidas (<http://www.bipm.org> ou <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>).

Notas de rodapé no texto principal: devem ser indicadas por meio de asteriscos e restritas ao mínimo indispensável.

Figuras: fotografias, micrografias e radiografias devem ter uma largura mínima de 10 cm, resolução mínima de 500 dpi, e devem ser fornecidas em formato TIFF. Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais devem ser fornecidos em formato PDF.

Todas as figuras devem ser submetidas, individualmente, em arquivos separados (Figure 1a, Figure 1b, Figure 2...) e não inseridas no arquivo de texto. As figuras devem ser numeradas e citadas consecutivamente no corpo do texto, em algarismos arábicos. As legendas das figuras devem ser inseridas todas juntas no final do texto, após as referências.

Características e formatação dos tipos de manuscritos

Pesquisa Original

Devem ser limitados a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Será aceito um máximo de 8 (oito) figuras e 40 (quarenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Resumo de Pesquisa Original (*Short Communication*)

Devem ser limitados a 10.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). É permitido um máximo de 2 (duas) figuras e 12 (doze) referências. O resumo deve conter, no máximo, 100 palavras.

Formatação

- Folha de rosto
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Referências - máximo de 40 referências
- Legendas de figuras
- Figuras - máximo de 8 figuras, conforme descrito acima
- Tabelas.

Revisão Crítica de Literatura

A submissão desse tipo de manuscrito será realizada apenas a convite da Comissão de Publicação da BOR. Todos os manuscritos serão submetidos à revisão por pares. Esse tipo de manuscrito deve ter um conteúdo descritivo-discursivo, com foco numa apresentação e discussão abrangente de questões científicas importantes e inovadoras, e ser limitado a 30.000 caracteres incluindo espaços (considerando-se, introdução, metodologia, resultados, discussão, conclusão, agradecimentos, tabelas, referências e legendas de figuras). Incluir uma apresentação clara do objeto científico de interesse, argumentação lógica, uma análise crítica metodológica e teórica dos estudos e uma conclusão resumida. É permitido um máximo de 6 (seis) figuras e 50 (cinquenta) referências. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação

- Folha de rosto
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Descritores - de 3 (três) a 5 (cinco) descritores principais
- Introdução
- Metodologia
- Resultados
- Discussão
- Conclusão
- Agradecimentos
- Referências - máximo de 50 referências
- Legendas de figuras
- Figuras - máximo de 6 (seis) figuras, conforme descrito acima
- Tabelas.

Revisão Sistemática e Meta-Análise

Ao resumir os resultados de estudos originais, sejam eles quantitativos ou qualitativos, esse tipo de manuscrito deve responder a uma questão específica, ser limitado a 30.000 caracteres, incluindo espaços, e seguir o estilo e formato Cochrane. O manuscrito deve informar detalhadamente como se deu o processo de busca e recuperação dos trabalhos originais, o critério de seleção dos estudos incluídos na revisão e fornecer um resumo dos resultados obtidos nos estudos revisados (com ou sem uma abordagem de meta-análise). Não há limite para a quantidade de referências e figuras. Tabelas e figuras, caso sejam incluídas, devem apresentar as características dos estudos revisados, as intervenções que foram comparadas e respectivos resultados, além dos estudos excluídos da revisão. Demais tabelas e figuras pertinentes à revisão devem ser apresentadas como descrito anteriormente. O resumo deve conter, no máximo, 250 palavras.

Formatação

- Folha de rosto
- Texto principal (30.000 caracteres incluindo espaços)
- Resumo - máximo de 250 palavras
- Formulação da pergunta
- Localização dos estudos
- Avaliação crítica Coleta de dados
- Análise e apresentação dos dados
- Aprimoramento
- Atualização da revisão
- Referências - não há limite para a quantidade de referências
- Figuras - não há limite para a quantidade de figuras
- Tabelas.

Carta ao Editor

Cartas devem incluir evidências que sustentem a opinião do(s) autor(es) sobre o conteúdo científico ou editorial da BOR, e ser limitadas a 500 palavras. Figuras ou tabelas não são permitidas

"Checklist" para Submissão Inicial

- Arquivo de folha de rosto (*Title Page*, em formato DOC, DOCX ou RTF).
- Arquivo do texto principal (*Main Document*, manuscrito), em formato DOC, DOCX ou RTF.
- Tabelas, em formato DOC, DOCX ou EXCELL.
- Figuras: Fotografias, micrografias e radiografias (largura mínima de 10 cm e resolução mínima de 500 DPI) em formato TIFF. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images>).
- Gráficos, desenhos, esquemas e demais ilustrações vetoriais em formato PDF.

Cada uma das figuras deve ser submetida em arquivos separados e individuais (não inseridas no arquivo de texto).

Declaração de interesses e de financiamento, submetida em um documento separado e em formato PDF.

Termo de transferência de direitos autorais e declarações de responsabilidade

O manuscrito submetido para publicação deve ser acompanhado do Termo de Transferência de Direitos Autorais e Declarações de Responsabilidade, disponível no sistema online e de preenchimento obrigatório.

Plágio

A **BOR** emprega um sistema de detecção de plágio. Ao enviar o seu manuscrito para a Revista, este manuscrito poderá ser rastreado. Isto não tem relação com a simples repetição de nomes / filiações, mas envolve frases ou textos utilizados.

Custo para publicação

A *Brazilian Oral Research (BOR)* cobrará uma taxa de R\$ 150,00 (reais) (para autor correspondente brasileiro) e US\$ 35,00 (dólares americanos) (para autor correspondente estrangeiro) por página adicional superior a 10 páginas publicadas/impressas (incluindo figuras e tabelas). Tal taxa será aplicada aos artigos submetidos ao BOR após 1º de outubro de 2023 e aceitos para publicação. Artigos com até 10 páginas publicadas/impressas não serão cobrados.

Exemplos de referências

Periódicos

Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in developing countries: a review of the evidence. *Pediatrics*. 2005;115(2 Suppl):519-617. <https://doi.org/10.1542/peds.2004-1441>

Mattos FF, Pordeus IA. COVID-19: a new turning point for dental practice. *Braz Oral Res*. 2020;34:e085. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0085>

Artigos com Título e Texto em Idioma Diferente do Inglês

Li YJ, He X, Liu LN, Lan YY, Wang AM, Wang YL. [Studies on chemical constituents in herb of *Polygonum orientale*]. *Zhongguo Ahong Yao Za Zhi*. 2005 Mar;30(6):444-6. Chinese.

Suplementos ou Edições Especiais

Pucca Junior GA, Lucena EHG, Cawahisa PT. Financing national policy on oral health in Brazil in the context of the Unified Health System. *Braz Oral Res*. 2010 Aug;24 Spec Iss 1:26-32.

Livros

Stedman TL. *Stedman's medical dictionary: a vocabulary of medicine and its allied sciences, with pronunciations and derivations*. 20th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961.

Livros Online

Foley KM, Gelband H, editors. Improving palliative care for cancer [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>

Websites

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>
Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage]. Brasília (DF): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010 [cited 2010 Nov 27]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>

World Health Organization [homepage]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 2011 Jan 17]. Available from: <http://www.who.int/en/>

ANEXO C- Diretrizes para publicação de trabalhos na Journal of Child Health Care.
(Artigo 2)

Fator de Impacto: **1,9** / Fator de impacto de 5 anos: **2,3**



Subject: Journal of Child Health Care JCHC-2023-0163

Body: 24-Apr-2023

Dear Dr. MONTEIRO:

Your manuscript entitled "Hospital indicators and control of oral biofilm in children under invasive mechanical ventilation after performing an oral hygiene protocol" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Child Health Care.

Your manuscript ID is JCHC-2023-0163.

You have listed the following individuals as authors of this manuscript:
MONTEIRO, TANIA; VIDAL, FLAVIA; ALMONDES, CAMILA; DA SILVA, FÁBIO; SOUZA, LUANA;
RODRIGUES, VANDILSON; LOPES, FERNANDA

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jchc> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jchc>.

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID (<https://orcid.org/>). We encourage all authors and co-authors to use ORCID iDs during the peer review process. If you have not already logged in to your account on this journal's ScholarOne Manuscripts submission site in order to update your account information and provide your ORCID identifier, we recommend that you do so at this time by logging in and editing your account information. In the event that your manuscript is accepted, only ORCID iDs validated within your account prior to acceptance will be considered for publication alongside your name in the published paper as we cannot add ORCID iDs during the Production steps. If you do not already have an ORCID iD you may login to your ScholarOne account to create your unique identifier and automatically add it to your profile.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Child Health Care.

Sincerely,
Miss Piyano Rema
Journal of Child Health Care
chc.pra@sagepub.com

Date Sent: 24-Apr-2023

SEÇÕES DO MANUSCRITO

O *Journal of Child Health Care* publica **artigos originais teóricos, empíricos e de revisão sistemática** sobre questões de saúde infantil.

Os artigos geralmente têm entre 3.000 e 5.000 palavras (excluindo referências, figuras e tabelas). O limite máximo de palavras (5000 palavras) será rigorosamente respeitado e os trabalhos que ultrapassarem o limite de palavras serão devolvidos aos autores para revisão. É permitido um máximo de 50 referências.

A seguir estão os requisitos gerais para relatórios nas seções de todos os desenhos de estudo e formatos de manuscritos.

a. Folha de rosto

As informações gerais sobre um artigo e seus autores são apresentadas na página de título do manuscrito e geralmente incluem o título do artigo, informações do autor, quaisquer isenções de responsabilidade, fontes de apoio, contagem de palavras e, às vezes, o número de tabelas e figuras.

Título do artigo. O título fornece uma descrição resumida do artigo completo e deve incluir informações que, juntamente com o resumo, tornarão a recuperação eletrônica do artigo sensível e específica. As diretrizes para relatórios recomendam e alguns periódicos exigem que as informações sobre o desenho do estudo façam parte do título (particularmente importante para ensaios randomizados e revisões sistemáticas e meta-análises). Alguns periódicos exigem um título curto, geralmente com no máximo 40 caracteres (incluindo letras e espaços) na página de título ou como uma entrada separada em um sistema eletrônico de submissão. Os sistemas de submissão eletrônica podem restringir o número de caracteres do título.

Informações do autor. Os títulos acadêmicos mais elevados de cada autor devem ser listados, embora alguns periódicos não os publiquem. Deverá ser especificado o nome do(s) departamento(s) e instituição(ões) ou organizações onde o trabalho deverá ser atribuído. A maioria dos sistemas de submissão eletrônica exige que os autores forneçam informações completas de contato, incluindo correspondência e endereços de e-mail, mas a página de título deve listar o número de telefone e endereço de e-mail do autor correspondente. O ICMJE incentiva a listagem da Identificação Aberta de Pesquisador e Contribuidor (ORCID) dos autores.

Isenções de responsabilidade. Um exemplo de isenção de responsabilidade é a declaração do autor de que as opiniões expressas no artigo submetido são suas e não uma posição oficial da instituição ou financiador.

Fonte(s) de apoio. Estes incluem subsídios, equipamentos, medicamentos e/ou outros apoios que facilitaram a condução do trabalho descrito no artigo ou a redação do próprio artigo. A atribuição inadequada de fontes de financiamento e afiliações é enganosa e deve ser evitada.

Contagem de palavras. Uma contagem de palavras para o texto do artigo, excluindo resumo, agradecimentos, tabelas, legendas de figuras e referências, permite que editores e revisores avaliem se as informações contidas no artigo garantem a extensão do artigo e se o manuscrito submetido se enquadra nos formatos da revista e limites de palavras. Uma contagem de palavras separada para o resumo é útil pelo mesmo motivo.

Número de figuras e tabelas. Alguns sistemas de submissão exigem a especificação do número de figuras e tabelas antes de carregar os arquivos relevantes. Esses números permitem que a equipe editorial e os revisores confirmem se todas as figuras e tabelas foram realmente incluídas no manuscrito e, como as tabelas e figuras ocupam espaço, avaliem se as informações fornecidas pelas figuras e tabelas

justificam o tamanho do artigo e se o manuscrito se enquadra dentro limites de espaço da revista.

Divulgação de relacionamentos e atividades. As informações de divulgação de cada autor precisam fazer parte do manuscrito; cada periódico deve desenvolver padrões com relação à forma que a informação deve assumir e onde será publicada. O ICMJE desenvolveu um Formulário de Divulgação uniforme para uso pelos periódicos membros do ICMJE, e o ICMJE incentiva outros periódicos a adotá-lo. Apesar da disponibilidade do formulário, os editores podem exigir a divulgação de relacionamentos e atividades na página de título do manuscrito ou em outra seção de Divulgação do manuscrito para poupar o trabalho de coleta de formulários de cada autor antes de tomar uma decisão editorial ou para salvar o trabalho dos revisores e leitores. de ler o formulário de cada autor.

b. Resumo

Pesquisas originais, revisões sistemáticas e meta-análises requerem resumos estruturados. O resumo deve fornecer o contexto ou antecedentes do estudo e indicar o objetivo do estudo, procedimentos básicos (seleção dos participantes do estudo, configurações, medições, métodos analíticos), principais conclusões (fornecendo tamanhos de efeito específicos e seu significado estatístico e clínico, se possível). Deve enfatizar aspectos novos e importantes do estudo ou das observações, observar limitações importantes e não interpretar excessivamente os resultados. Os resumos de ensaios clínicos devem incluir itens que o grupo CONSORT tenha identificado como essenciais. As fontes de financiamento devem ser listadas separadamente após o resumo para facilitar a exibição e indexação adequadas para recuperação de pesquisa pelo MEDLINE.

Como os resumos são a única parte substantiva do artigo indexada em muitas bases de dados eletrônicas e a única parte lida por muitos leitores, os autores precisam garantir que eles reflitam com precisão o conteúdo do artigo. Infelizmente, as informações contidas nos resumos muitas vezes diferem daquelas contidas no texto. Autores e editores devem trabalhar no processo de revisão e revisão para garantir que as informações sejam consistentes em ambos os locais. O formato exigido para resumos estruturados difere de periódico para periódico, e alguns periódicos utilizam mais de um formato; os autores precisam preparar seus resumos no formato especificado pela revista escolhida.

O ICMJE recomenda que os periódicos publiquem o número de registro do ensaio clínico ao final do resumo. O ICMJE também recomenda que, quando um número de registro estiver disponível, os autores listem esse número na primeira vez que usarem um acrônimo de ensaio para se referir ao ensaio que estão relatando ou a outros ensaios que mencionam no manuscrito. Caso os dados tenham sido depositados em repositório público e/ou estejam sendo utilizados em análise secundária, os autores deverão indicar no final do resumo o identificador único e persistente do conjunto de dados, o nome e o número do repositório.

c. Introdução

Forneça um contexto ou antecedentes para o estudo (ou seja, a natureza do problema e seu significado). Declare o propósito específico ou objetivo de pesquisa ou hipótese testada pelo estudo ou observação. Cite apenas referências diretamente pertinentes e não inclua dados ou conclusões do trabalho relatado.

d. Métodos

O princípio orientador da seção Métodos deve ser a clareza sobre como e por que um estudo foi realizado de uma determinada maneira. A seção Métodos deve ter como objetivo ser suficientemente detalhada para que outras pessoas com acesso aos dados possam reproduzir os resultados. Em geral, a seção deve incluir apenas informações que estavam disponíveis no momento em que o plano ou protocolo do estudo foi escrito; todas as informações obtidas durante o estudo pertencem à seção Resultados. Se uma organização foi paga ou contratada de outra forma para ajudar a conduzir a investigação (os exemplos incluem a recolha e gestão de dados), então isto deve ser detalhado nos métodos.

A seção Métodos deve incluir uma declaração indicando que a pesquisa foi aprovada por um órgão independente de revisão local, regional ou nacional (por exemplo, comitê de ética, conselho de revisão institucional). Se existir dúvida se a investigação foi conduzida de acordo com a Declaração de Helsínquia, os autores devem explicar a fundamentação da sua abordagem e demonstrar que o órgão de revisão local, regional ou nacional aprovou explicitamente os aspectos duvidosos do estudo. (Ver seção II.E.)

Seleção e Descrição dos Participantes

Descreva claramente a seleção de participantes observacionais ou experimentais (indivíduos saudáveis ou pacientes, incluindo controles), incluindo critérios de elegibilidade e exclusão e uma descrição da população de origem. Como a relevância de variáveis como idade, sexo ou etnia nem sempre é conhecida no momento do desenho do estudo, os investigadores devem procurar a inclusão de populações representativas em todos os tipos de estudo e, no mínimo, fornecer dados descritivos para estas e outras variáveis demográficas relevantes. Comente sobre quão representativa é a amostra do estudo em relação à maior população de interesse.

Garantir o uso correto dos termos sexo (ao relatar fatores biológicos) e gênero (fatores de identidade, psicossociais ou culturais) e, a menos que seja inadequado, relatar o sexo e/ou gênero dos participantes do estudo, o sexo dos animais ou células, e descrever o métodos usados para determinar sexo e gênero. Se o estudo foi realizado envolvendo uma população exclusiva, por exemplo, em apenas um sexo, os autores deveriam justificar o porquê. Os autores devem definir como determinaram raça ou etnia e justificar sua relevância. Caso não tenha sido coletada raça ou etnia, explique por que não foi coletada. Raça e etnia são construções sociais e não biológicas; os autores devem interpretar os resultados associados à raça e etnia nesse contexto. Os autores devem usar

uma linguagem neutra, precisa e respeitosa para descrever os participantes do estudo e evitar o uso de terminologia que possa estigmatizar os participantes.

Informação técnica

Especifique os objetivos principais e secundários do estudo – geralmente identificados como resultados primários e secundários. Identifique métodos, equipamentos (forneça o nome e endereço do fabricante entre parênteses) e procedimentos com detalhes suficientes para permitir que outros reproduzam os resultados. Forneça referências a métodos estabelecidos, incluindo métodos estatísticos (ver abaixo); fornecer referências e breves descrições de métodos que foram publicados, mas não são bem conhecidos; descrever métodos novos ou substancialmente modificados, apresentar as razões para utilizá-los e avaliar suas limitações. Identifique com precisão todos os medicamentos e produtos químicos utilizados, incluindo nome(s) genérico(s), dose(s) e via(s) de administração. Identifique nomes científicos e nomes de genes apropriados.

Estatísticas

Descrever métodos estatísticos com detalhes suficientes para permitir que um leitor experiente com acesso aos dados originais possa julgar sua adequação para o estudo e verificar os resultados relatados. Quando possível, quantificar os resultados e apresentá-los com indicadores apropriados de erro de medição ou incerteza (tais como intervalos de confiança). Evite confiar apenas em testes estatísticos de hipóteses, como valores P , que não transmitem informações importantes sobre o tamanho do efeito e a precisão das estimativas. As referências para o desenho do estudo e métodos estatísticos devem ser referências a trabalhos padrão, quando possível (com páginas indicadas). Defina termos estatísticos, abreviações e a maioria dos símbolos. Especifique o(s) pacote(s) de software estatístico e as versões utilizadas. Distinguir análises pré-especificadas de análises exploratórias, incluindo análises de subgrupos.

e. Resultados

Apresente seus resultados em sequência lógica no texto, tabelas e figuras, apresentando primeiro as descobertas principais ou mais importantes. Não repita todos os dados das tabelas ou figuras do texto; enfatize ou resuma apenas as observações mais importantes. Forneça dados sobre todos os resultados primários e secundários identificados na Seção de Métodos. Materiais extras ou suplementares e detalhes técnicos poderão ser colocados em apêndice onde serão acessíveis, mas não interromperão o fluxo do texto, ou poderão ser publicados exclusivamente na versão eletrônica da revista.

Forneça resultados numéricos não apenas como derivadas (por exemplo, porcentagens), mas também como números absolutos a partir dos quais as derivadas foram calculadas. Restrinja as tabelas e figuras às necessárias para explicar o argumento do artigo e para avaliar os dados de apoio. Utilize gráficos como alternativa a tabelas com muitas entradas; não duplique dados em gráficos e tabelas. Evite usos não técnicos de

termos técnicos em estatística, como “aleatório” (que implica um dispositivo de randomização), “normal”, “significativo”, “correlações” e “amostra”.

A notificação separada de dados por variáveis demográficas, como idade e sexo, facilita o agrupamento de dados para subgrupos entre estudos e deve ser rotina, a menos que haja razões imperiosas para não estratificar a notificação, o que deve ser explicado.

f. Discussão

É útil começar a discussão resumindo brevemente as principais conclusões e explorando possíveis mecanismos ou explicações para essas descobertas. Enfatize os aspectos novos e importantes do seu estudo e coloque as suas descobertas no contexto da totalidade das evidências relevantes. Declare as limitações do seu estudo e explore as implicações das suas descobertas para pesquisas futuras e para a prática clínica ou política. Discuta a influência ou associação de variáveis, como sexo e/ou gênero, nas suas conclusões, quando apropriado, e as limitações dos dados. Não repita detalhadamente dados ou outras informações fornecidas em outras partes do manuscrito, como na introdução ou na seção de resultados.

Vincule as conclusões aos objetivos do estudo, mas evite declarações não qualificadas e conclusões que não sejam adequadamente apoiadas pelos dados. Em particular, distinguir entre significância clínica e estatística e evitar fazer declarações sobre benefícios e custos econômicos, a menos que o manuscrito inclua dados e análises econômicas apropriadas. Evite reivindicar prioridade ou fazer alusão a trabalhos que não foram concluídos. Estabeleça novas hipóteses quando justificado, mas rotule-as claramente.

g. Referências

Considerações gerais

Os autores devem fornecer referências diretas às fontes originais da pesquisa sempre que possível. As referências não devem ser usadas por autores, editores ou revisores para promover interesses próprios. Os autores devem evitar citar artigos em periódicos predatórios ou pseudo-revistas. Quando preprints são citados, a citação deve indicar claramente que a referência é um preprint (ver também Seção III.D.3). Embora as referências a artigos de revisão possam ser uma forma eficiente de orientar os leitores para um corpo de literatura, os artigos de revisão nem sempre refletem com precisão o trabalho original. Por outro lado, listas extensas de referências a trabalhos originais sobre um tópico podem ocupar espaço excessivo. Menos referências a artigos originais importantes muitas vezes servem tão bem como listas mais exaustivas, particularmente porque as referências podem agora ser adicionadas à versão eletrônica de artigos publicados, e porque a pesquisa eletrônica de literatura permite aos leitores recuperar a literatura publicada de forma eficiente.

As referências a artigos aceitos, mas ainda não publicados, devem ser designadas como “no prelo” ou “em breve”. Informações de manuscritos submetidos, mas não

aceitos devem ser citadas no texto como “observações não publicadas” com permissão por escrito da fonte.

Os artigos publicados devem fazer referência aos identificadores únicos e persistentes dos conjuntos de dados utilizados. Evite citar uma “comunicação pessoal”, a menos que forneça informações essenciais não disponíveis em fonte pública; nesse caso, o nome da pessoa e a data da comunicação devem ser citados entre parênteses no texto. Para artigos científicos, obtenha permissão por escrito e confirmação de precisão da fonte da comunicação pessoal.

Alguns periódicos, mas não todos, verificam a precisão de todas as citações de referência; assim, erros de citação às vezes aparecem na versão publicada dos artigos. Para minimizar tais erros, as referências devem ser verificadas utilizando uma fonte bibliográfica eletrônica, como PubMed, ou cópias impressas de fontes originais. Os autores são responsáveis por verificar se nenhuma das referências cita artigos retratados, exceto no contexto de referência à retratação. Para artigos publicados em periódicos indexados no MEDLINE, o ICMJE considera o PubMed a fonte oficial de informações sobre retratações. Os autores podem identificar artigos retratados no MEDLINE pesquisando no PubMed por "Publicação retratada [pt]", onde o termo "pt" entre colchetes significa tipo de publicação, ou acessando diretamente a lista de publicações retratadas do PubMed.

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que são mencionadas pela primeira vez no texto. Identifique referências em textos, tabelas e legendas por algarismos arábicos entre parênteses.

As referências citadas apenas em tabelas ou legendas de figuras deverão ser numeradas de acordo com a seqüência estabelecida pela primeira identificação no texto da tabela ou figura específica. Os títulos dos periódicos deverão ser abreviados de acordo com o estilo utilizado para o MEDLINE (www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals). Os periódicos variam quanto a pedir aos autores que citem referências eletrônicas entre parênteses no texto ou em referências numeradas após o texto. Os autores devem consultar a revista para a qual pretendem submeter o seu trabalho.

Estilo e Formato

As referências devem seguir os padrões resumidos na página Sample References do NLM e detalhados no Citing Medicine do NLM, 2ª edição. Esses recursos são atualizados regularmente à medida que novas mídias se desenvolvem e atualmente incluem orientações para documentos impressos; material inédito; meios de comunicação audiovisuais; material em CD-ROM, DVD ou disco; e materiais na Internet.

h. Tabelas

As tabelas capturam informações de forma concisa e as exibem de forma eficiente; eles também fornecem informações em qualquer nível desejado de detalhe e

precisão. A inclusão frequente de dados em tabelas em vez de texto permite reduzir o comprimento do texto.

Preparar tabelas de acordo com as exigências específicas da revista; para evitar erros é melhor que as tabelas possam ser importadas diretamente para o software de publicação da revista. Numere as tabelas consecutivamente na ordem de sua primeira citação no texto e forneça um título para cada uma delas. Os títulos das tabelas devem ser curtos, mas autoexplicativos, contendo informações que permitam ao leitor compreender o conteúdo da tabela sem a necessidade de voltar ao texto. Certifique-se de que cada tabela seja citada no texto.

Dê a cada coluna um título curto ou abreviado. Os autores devem colocar matéria explicativa em notas de rodapé e não no título. Explique todas as abreviações fora do padrão nas notas de rodapé e use símbolos para explicar as informações, se necessário. Os símbolos podem variar de periódico para periódico (letra do alfabeto ou símbolos como *, †, ‡, §), portanto, verifique as instruções de cada periódico para autores para a prática necessária. Identifique medidas estatísticas de variações, como desvio padrão e erro padrão da média.

Se você usar dados de outra fonte publicada ou não publicada, obtenha permissão e reconheça totalmente essa fonte.

Tabelas adicionais contendo dados de backup muito extensos para publicação impressa podem ser apropriadas para publicação na versão eletrônica da revista, depositadas em um serviço de arquivo ou disponibilizadas aos leitores diretamente pelos autores. Uma declaração apropriada deve ser adicionada ao texto para informar aos leitores que esta informação adicional está disponível e onde está localizada. Envie essas tabelas para consideração com o artigo, para que fiquem disponíveis aos revisores.

i. Ilustrações (Figuras)

As imagens digitais das ilustrações do manuscrito devem ser submetidas em formato adequado para publicação impressa. A maioria dos sistemas de submissão possui instruções detalhadas sobre a qualidade das imagens e as verifica após o upload do manuscrito. Para envios impressos, as figuras devem ser desenhadas e fotografadas profissionalmente ou enviadas como impressões digitais com qualidade fotográfica.

Para imagens radiológicas e outras imagens clínicas e diagnósticas, bem como fotos de espécimes patológicos ou fotomicrografias, enviar arquivos de imagens fotográficas de alta resolução. As imagens de antes e depois devem ser tiradas com a mesma intensidade, direção e cor de luz. Como os borrões são usados como evidência primária em muitos artigos científicos, os editores podem exigir o depósito das fotografias originais dos borrões no site da revista.

Embora alguns periódicos redesenhem os números, muitos não o fazem. As letras, números e símbolos nas figuras devem, portanto, ser claros e consistentes, e grandes o suficiente para permanecerem legíveis quando a figura for reduzida para publicação. As

figuras devem ser tão autoexplicativas quanto possível, pois muitas serão usadas diretamente em apresentações de slides. Os títulos e as explicações detalhadas pertencem às legendas – e não às ilustrações em si.

As fotomicrografias deverão ter marcadores internos de escala. Os símbolos, setas ou letras utilizadas nas fotomicrografias devem contrastar com o fundo. Explique a escala interna e identifique o método de coloração nas fotomicrografias.

As figuras deverão ser numeradas consecutivamente de acordo com a ordem em que foram citadas no texto. Se uma figura tiver sido publicada anteriormente, reconheça a fonte original e envie permissão por escrito do detentor dos direitos autorais para reproduzi-la. A permissão é necessária independentemente da autoria ou editora, exceto para documentos de domínio público.

No manuscrito, as legendas das ilustrações deverão estar em página separada, com algarismos arábicos correspondentes às ilustrações. Quando símbolos, setas, números ou letras forem usados para identificar partes das ilustrações, identifique e explique cada um deles claramente na legenda.

Artigos em periódicos

1. Artigo de periódico padrão

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Transplante de órgãos sólidos em pacientes infectados pelo HIV. *N Engl J Med.* 25 de julho de 2002;347(4):284-7.

Liste os primeiros seis autores, seguidos de et al. Se houver mais de seis autores, liste os primeiros seis autores, seguidos de et al. (Nota: NLM agora lista todos os autores.):

Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulação das concentrações de aminoácidos excitatórios intersticiais após lesão por contusão cortical. *Cérebro Res.* 2002;935(1-2):40-6.

Opcional: Se uma revista tiver paginação contínua ao longo de um volume (como fazem muitas revistas médicas), omita o mês e o número da edição.

Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Transplante de órgãos sólidos em pacientes infectados pelo HIV. *N Engl J Med.* 2002;347:284-7.

Opcional: adição de identificadores exclusivos de um banco de dados, como o PubMed PMID, para a citação:

Forooghian F, Yeh S, Faia LJ, Nussenblatt RB. Atrofia foveal uveítica: características clínicas e associações. *Arco Oftalmol.* Fevereiro de 2009;127(2):179-86. PubMedPMID: 19204236; PubMed Central PMCID: PMC2653214.

Opcional: Adição de número de registro de ensaio clínico:

Trachtenberg F, Maserejian NN, Soncini JA, Hayes C, Tavares M. O flúor em compômeros previne futuras cáries em crianças? J Dent Res. Março de 2009;88(3):276-9. PubMed PMID: 19329464. Número de registro ClinicalTrials.gov: NCT00065988.

2. Organização como autor

Grupo de Pesquisa do Programa de Prevenção de Diabetes. Hipertensão, insulina e pró-insulina em participantes com tolerância diminuída à glicose. Hipertensão. 2002;40(5):679-86.

3. Autores pessoais e organização como autor (liste todos conforme aparecem na assinatura).

Vallancien G, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ; Grupo de Estudos Alf-One. Disfunção sexual em 1.274 homens europeus que sofrem de sintomas do trato urinário inferior. J Urol. 2003;169(6):2257-61.

4. Volume com suplemento

Geraud G, Spierings EL, Keywood C. Tolerabilidade e segurança do frovatriptano com uso de curto e longo prazo para tratamento de enxaqueca e em comparação com sumatriptano. Dor de cabeça. 2002;42 Suplemento 2:S93-9.

Livros e outras monografias

5. Autor(es) pessoal(eis)

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Microbiologia médica. 4ª edição. São Luís: Mosby; 2002.

6. Capítulo de um livro

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Alterações cromossômicas em tumores sólidos humanos. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editores. A base genética do câncer humano. Nova York: McGraw-Hill; 2002. pág. 93-113.

7. Dissertação

Borkowski, MM. Sono e alimentação infantil: uma pesquisa telefônica com hispano-americanos [dissertação]. Mount Pleasant (MI): Universidade Central de Michigan; 2002.

Material eletrônico

8. CD ROM

Anderson SC, Poulsen KB. Atlas eletrônico de hematologia de Anderson [CD-ROM]. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

9. Artigo de jornal na Internet

Abood S. Iniciativa de melhoria da qualidade em lares de idosos: a ANA desempenha um papel consultivo. *Sou J Nurs* [Internet]. 2002 junho [citado em 12 de agosto de 2002];102(6):[cerca de 1 p.]. Disponível em: https://journals.lww.com/ajnonline/Fulltext/2002/06000/Quality_Improvement_Initiative_in_Nursing_Homes.31.aspx É necessária assinatura.

Apresentação opcional (omite a frase entre colchetes que qualifica a abreviatura do título do periódico):

Abood S. Iniciativa de melhoria da qualidade em lares de idosos: a ANA desempenha um papel consultivo. *Sou J Nurs*. 2002 junho [citado em 12 de agosto de 2002];102(6):[cerca de 1 p.]. Disponível em: https://journals.lww.com/ajnonline/Fulltext/2002/06000/Quality_Improvement_Initiative_in_Nursing_Homes.31.aspx É necessária assinatura.

Artigo publicado na Internet antes da versão impressa:
Ver nº 18 .

Formatos opcionais usados pelo NLM no MEDLINE/PubMed:

Artigo com número de documento no lugar da paginação tradicional:

Williams JS, Brown SM, Conlin PR. Vídeos em medicina clínica. Medição da pressão arterial. *N Engl J Med*. 29 de janeiro de 2009;360(5):e6. PMID PubMed: 19179309.

Artigo com Identificador de Objeto Digital (DOI):

Zhang M, Holman CD, Preço SD, Sanfilippo FM, Preen DB, Bulsara MK. Comorbidade e repetição de internação hospitalar por reações adversas a medicamentos em idosos: estudo de coorte retrospectivo. *BMJ*. 7 de janeiro de 2009;338:a2752. doi: 10.1136/bmj.a2752. PMID PubMed: 19129307; PubMed Central PMCID: PMC2615549.

Artigo com identificador exclusivo de item do editor (pii) no lugar da paginação tradicional ou DOI:

Tegnell A, Dillner J, Andrae B. Introdução da vacinação contra o papilomavírus humano (HPV) na Suécia. Fiscalização do Euro. 12 de fevereiro de 2009;14(6). pii: 19119. PubMed PMID: 19215721.

10. Monografia na Internet

Foley KM, Gelband H, editores. Melhorando os cuidados paliativos para o câncer [Internet]. Washington: Imprensa da Academia Nacional; 2001 [citado em 9 de julho de 2002]. Disponível em: <https://www.nap.edu/catalog/10149/improving-palliative-care-for-cancer> .

11. Página inicial/site

eatright.org [Internet]. Chicago: Academia de Nutrição e Dietética; c2016 [consultado em 27 de dezembro de 2016]. Disponível em: <https://www.eatright.org/> .

12. Parte de uma página inicial/site

Associação Médica Americana [Internet]. Chicago: A Associação; c1995-2016 [consultado em 27 de dezembro de 2016]. Escritório de Medicina Internacional; [cerca de 2 telas]. Disponível em: <https://www.ama-assn.org/about/office-international-medicine>