ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES INTERNADOS EM UTI.

Bruno Diniz Batista (Bolsista FA), Shelon Cristina Souza Bandeca, e-mail: shelonsouzap@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Odontologia / Ciências da Saúde.

2.12.00.00-9 Microbiologia, 2.12.01.00-5 Biologia, Fisiologia dos Microrganismos.

Palavras-chave: saúde pública, microbiologia, medicina intensiva.

Resumo

Pacientes internados podem apresentar uma microbiota bucal composta por microrganismos nem sempre encontrados em indivíduos saudáveis, os quais possuem a capacidade de desencadear a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV). Portanto, o objetivo do presente projeto é verificar a presença e a alteração dos microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Enterococcus spp* relacionados à PAV na cavidade bucal em três momentos diferentes (inicial –24hora, 48 horas e 96 horas do internamento) em uma amostra de 20 pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) e em uso de intubação orotraqueal (IOT). Concluiu-se que os microrganismos mais incidentes na UTI do HURCG seguem o padrão observado em outros estudos como por exemplo *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* sendo este último o que apresentou maior incidência. Além disso, inferiu-se a necessidade de uma equipe multiprofissional para o cuidado integral dos pacientes internados a fim do controle da PAV.

Introdução

A microbiota bucal residente é essencial para saúde em um indivíduo, pois participa no desenvolvimento do sistema imune e serve de barreira contra micro-organismos patogênicos. Na cavidade bucal existem mais de 700 espécies de micro-organismos, que promovem a homeostase bucal (ZARCO; VESS; GINSBURG, 2012). Estudos demonstram que na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, os microrganismos mais comuns encontrados correspondem ao *Streptococcus, Veillonella, Neisseira, Prevotella* e *Fusobacterium* (HASAN et al, 2014).

No entanto, quando há um desequilíbrio da microbiota bucal, as bactérias residentes associam-se com a etiologia de alterações bucais como a doença cárie e a doença periodontal, e de alterações sistêmicas, principalmente, infecções do trato respiratório (AGUIAR; OLIVEIRA, 2008). A alteração da microbiota bucal, assim como o internamento em uma unidade hospitalar expõe o organismo à condição de vulnerabilidade às Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) (FIDEL JUNIOR; LOURENÇO; FISCHER, 2013).

As IRAS são consideradas as principais causas de morbidade e de mortalidade no âmbito hospitalar, além de aumentarem o tempo de internamento do paciente, elevando o custo do tratamento (ANVISA, 2013). Dentre as IRAS mais comuns podem-se citar as infecções do trato respiratório como a Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica – PAV (AGUIAR; OLIVEIRA, 2008). Esta infecção é

responsável por cerca de 25% de todas as infecções adquiridas durante o internamento em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), e se desenvolve após 48 horas de intubação, sendo os cinco primeiros dias o período de maior ocorrência (ANVISA, 2013). As taxas de mortalidade em relação à PAV podem variar de 20 a 60%, porém esta infecção aumenta em média 12 dias o tempo de internamento hospitalar aumentando riscos de morbimortalidade ao paciente (ANVISA, 2013).
A PAV e as outras infecções do trato respiratório podem ser causadas por diversos micro-organismos hospitalares como *Klebsiella* spp, *Pseudomonas* spp. E *Staphyloccocus aureus* (FIDEL JUNIOR; LOURENÇO; FISCHER, 2013). Estes patógenos, que não são geralmente encontrados na cavidade bucal, podem estar presentes na microbiota bucal do paciente internado, disseminando-se pelo organismo (FIDEL JUNIOR; LOURENÇO; FISCHER, 2013). Os objetivos do presente estudo são verificar a presença e alterações dos micro-organismos: *Staphyloccocus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.* e *Enterococcus spp.* relacionados à PAV.

Material e Métodos
Primeiramente, foi realizada a abordagem para verificar se o responsável pelo paciente tem interesse em participar da pesquisa, e, consentindo através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa sob o número – 2.422.774. Após isso, realizou-se a avaliação odontológica inicial do paciente, com preenchimento da Ficha de Avaliação Odontológica. Em seguida, seguiu-se a coleta microbiológica antes da higiene bucal. A coleta do material biológico ocorreu no primeiro dia do internamento do paciente coleta 1 – tempo 24 horas, coleta 2 –tempo 48 horas; coleta 3 – tempo 96 horas, sendo feita nos cinco primeiros dias pelo mesmo pesquisador. As coletas foram feitas com uma escova citológica estéril, friccionando-a sob o dorso de língua. Posteriormente, condicionou-se a escova em um tubo de ensaio (16x160 mm) com3 mL de solução salina tamponada (PBS), conforme orientação da ANVISA (2013) e guardada em bolsa térmica. Os tubos de ensaio contendo o PBS foram previamente esterilizados em autoclave apropriada. Na sequência, o material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Microbiologia da UEPG.
A solução contendo a escova citológica foi inicialmente homogeneizada por um agitador (Vórtex) durante 60 segundos. Em seguida, dispensou-se 100 µL desta solução no centro das placas de Petri (20x100mm) em meios específicos e com auxílio de um *swab* estéril realizou-se a semeadura, pela técnica da placa cheia (quatro lados), em duplicata. As placas foram condicionadas em uma estufa a 35ºC entre 24 e 48 horas em ar ambiente. Todas as amostras foram semeadas em duplicata.
Para cada grupo de microrganismo analisado, foi investigada a presença de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva), Enterobactérias, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Para o isolamento dos microrganismos, as amostras foram inoculadas em meios de cultura, específicos ao grupo bacteriano em estudo, sendo: Ágar MacConkey para Enterobactérias, Ágar Cetrimide para *Pseudomonas*, Ágar Manitol-salgado para Estafilococos e Ágar Bile-esculina para *Enterococcus*.
A identificação das espécies de *Staphylococcus spp* isolados em ágar Manitol foi realizada através de provas bioquímicas específicas, como catalase, coagulase (Winn et al. 2008). As enterobactérias foram isoladas em Ágar MacConkey e identificadas através de provas fenotípicas específicas que incluíram o estudo da morfologia e do metabolismo bioquímico analisado pelo uso do Kit para

enterobactérias (NEWPROV, CURITIBA). As colônias negras sugestivas de *Enterococcus* isoladas em Ágar Bile-esculina foram replicadas em Ágar sangue. Após o crescimento, os microrganismos foram caracterizados como cocos Gram-positivos, catalase negativos, sorotipos positivos para o grupo D (AVAPATH STREP®, Omega Diagnostics) e identificados bioquimicamente conforme sistema de identificação proposto por Winn et al. (2008). Para identificação de *Pseudomonas aeruginosa* utilizou-se um conjunto de provas bioquímicas adequadas para bacilo Gram-negativo não fermentador da glicose (KiT ÑF-PROV – NEWPROV, CURITIBA).

Resultados e Discussão

No meio Bile-esculina, as colônias foram testadas para *Enterococcus spp* e obteve-se no tempo de 24 horas 10 amostras das quais 5 (50%) eram positivas. Ainda também, no período de 48 horas das 10 amostras analisadas observou-se positividade para 2(20%). Por fim, no tempo de 96 horas havia 14 amostras das quais 3(21%) eram positivas para *Enterococcus sp*.

No meio Cetrimide, as colônias foram testadas para *Pseudomonas aeruginosa* e obteve-se no tempo de 24 horas 7 amostras das quais 1 (14%) era positiva. Também, no período de 48 horas das 4 amostras obtidas observou-se positividade para 1 (25%). Por fim, no tempo de 96 horas havia 3 amostras das quais 1 (33%) era positiva para *Pseudomonas aeruginosa*.

No meio Manitol, as colônias foram testadas para *Staphylococcus aureus* e obteve-se no tempo de 24 horas 31 amostras das quais 7 (22%) eram positivas. Já no período de 48 horas, das 34 amostras obtidas observou-se positividade para 7 (20%). Por fim, no tempo de 96 horas havia 23 amostras das quais 4 (17%) eram positivas para *Staphylococcus aureus*. No meio MacConkey, as colônias foram testadas para Escherichia coli e obteve-se no tempo de 24 horas 4 amostras as quais apresentaram ambas resultado negativo. Já no período de 48 horas, das 6 amostras obtidas observou-se positividade para 1 (17%). Por fim, no período de 96 horas havia 7 amostras das quais 2 (18%) eram positivas para *Escherichia coli*.

Além disso, obteve-se como resultado quando analisada a incidência de crescimento de colônias bacterianas dos microrganismos estudados discriminadas por período de coleta os seguintes resultados: ambos os microrganismos *Enterococcus spp*, *Enterobactérias* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram maior crescimento no período de 96 horas e o *Staphylococcus aureus* apresentou maior crescimento no período de 24 horas.

Relacionando os microrganismos causadores de PAV, a pesquisa de David (1998), os patógenos comumente causadores de PAV foram *Pseudomonas spp*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp*, *Enterecoccus spp*. E ainda ressalta-se que essas infecções envolvem uma microbiota mista de bactérias anaeróbias e aeróbias consequentes da aspiração de infecções bucais, e colonização das vias aéreas superiores (DAVID, 1998). Em outro estudo, os microrganismos predominantes foram: (34%) *Enteroccocus spp*, (26%) *Pseudomonas aeruginosa* e (17%) *Staphylococcus aureus* (TOUFEN et al, 2003).

Na UTI do HURCG, os microrganismos mais encontrados causando a PAV são *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus spp*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Pode-se confirmar com o presente trabalho que existe realmente relação da PAV com esses microrganismos. Diferentemente de outros três estudos, a Pseudomonas aeruginosa é o patógeno mais comum da PAV (EVANAS et al, 2018). Entretanto, outros estudos referem que o *Staphylococcus*

coagulase-negativo foi a bactéria mais frequente (36%), seguindo do *Staphylococcus aureus* (19%) (ANDRADE; LEOPOLDO; HAS, 2006).
Em estudos de Zelante et al. (1982) mostrou-se a importância da cavidade bucal como reservatório de *Staphylococcus aureus*. Outros autores ainda afirmam que o *Staphylococcus spp.* não são isolados na cavidade bucal, e, quando isso ocorre eles são considerados microbiota transitória. Em indivíduos imunocomprometidos a presença destes microrganismos é bastante preocupante e também se verifica que pacientes com doença periodontal têm possíveis reservatórios destes microrganismos na cavidade bucal (ANDRADE; LEOPOLDO; HAS, 2006).

Conclusão

Constatou-se maior crescimento de *Staphylococcus aureus* em comparação aos demais microrganismos analisados. Além disso, foi observado que os microrganismos encontrados durante a análise das amostras de saliva dos pacientes internados na UTI do HURCG seguem o padrão identificado em outros estudos. Concluiu-se também que é imprescindível a inserção de uma equipe interdisciplinar nas unidades hospitalares, principalmente na UTI, para reduzir as taxas de morbimortalidade associada com a presença de bactérias patogênicas na cavidade bucal de pacientes hospitalizados nestas instituições.

Agradecimentos

Agradeço a Dra Profª Shelon Cristina Souza Bandeca, Universidade Estadual de Ponta Grossa e Fundação Araucária.

Referências

AGUIAR, M.C.A.; OLIVEIRA, E. R.A. Eficácia de medidas de higiene bucal sobre a microbiotal oral potencialmente patogênica para pneumonia aspirativa em idosos residentes em instituições de longa permanência [tese]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2008.
ANDRADE, D.; LEOPOLDO, V. C.; HAAS, V. J. Ocorrência de bactérias multirresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. Rev. Bras. Ter. Int., v. 18, n. 1, p. 31-7, 2006.
ANVISA –Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Série: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, p.1-92, 2013.
DAVID, C. M. N. Infecção em UTI. Medicina, v. 33, p. 337-348, 1998.
EVANS, C. R. et al. Keeping it Simple: Impact of a Restritive Antibiotic Policy for Ventilator-Associated Pneumonia in Trauma Patients on Incidence and Sesitivies of CausativePathogens. Surg. Infect (Larchmt), v. 19, n. 7, p. 672-678, 2018.
FIDEL JUNIOR, R. A. S.; LOURENÇO, R. A.; FISCHER, R. G. A doença periodontal e o idoso frágil. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 12, n. 1, p. 1-14, 2013.
HASAN, N. A.; et. al. Microbial community profiling of human saliva using shotgun metagenomic sequencing. *PLoS One,*9, e97699, 2014.
TOUFEN, J. C. et al. Prevalences rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. Rev. Hosp. Clin. Med. S. Paulo, v. 58, n. 5, p. 254-259, 2003.
ZELANTE, F. et al. Staphylococcus aureus na boca e no nariz de indivíduos sãos: verificação de identidade entre as cepas isoladas. Rev. Saúde Pública, v. 16, p. 92-96, 1982.