UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA SOCIAL

MÁRIO AUGUSTO HELUANY FILHO

**Uso de simbiótico para descolonização de pacientes hospitalizados
portadores de bacilos Gram-negativos multidrogarresistentes**

Ribeirão Preto

2016

MÁRIO AUGUSTO HELUANY FILHO

**Uso de simbiótico para descolonização de pacientes hospitalizados portadores de
bacilos Gram-negativos multidrogarresistentes**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Medicina Social, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, para obtenção do título de mestre em Saúde na Comunidade.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Bellissimo-Rodrigues

Ribeirão Preto

2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Heluany-Filho, Mário Augusto

Uso de simbiótico para descolonização de pacientes hospitalizados portadores de bacilos Gram-negativos multidroga-resistentes. Ribeirão Preto, 2016.

82p. : il. : 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Comunidade.

Orientador: Bellissimo-Rodrigues, Fernando.

1.Probiótico. 2.Prebiótico. 3.Simbiótico. 4.Descolonização. 5. Bacilos Gram-negativos multidroga-resistentes. 6.Pressão Contra-seletiva

Nome: HELUANY-FILHO, Mário Augusto

Título: Uso de simbiótico para descolonização de pacientes hospitalizados portadores de bacilos Gram-negativos multidroga-resistentes.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Medicina Social, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, para obtenção do título de mestre em Saúde na Comunidade.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____
Prof. Dr.	_____	Instituição:	_____
Julgamento:	_____	Assinatura:	_____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais Mário e Celi, os maiores incentivadores da minha vida, privilegiando o estudo acima de tudo e, desta forma, proporcionando-me mais esta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sempre, em primeiro lugar, a Deus, por todas as oportunidades a mim concedidas, e também aos orixás, que sempre me acompanham e me auxiliam.

À minha família, por todo o apoio necessário.

Em especial, agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues, por me guiar nessa trajetória, pelos ensinamentos, pela disponibilidade, paciência e principalmente pela compreensão nos momentos necessários.

À amiga Dra. Denissani pelos bons momentos de aprendizado que vivenciei no laboratório de microbiologia da Unidade de Emergência do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, também pelo incentivo dado para o ingresso neste curso de mestrado.

À Mariana, infectologista e pesquisadora colaboradora, peça fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe de profissionais da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do HC FMRP Campus, que me deram suporte técnico, incentivo e acima de tudo oportunidade de conviver com seres humanos ímpares e especiais.

À Equipe da Unidade de Pesquisa Clínica, parte fundamental na condução clínica desse ensaio experimental. Sem vocês esse trabalho provavelmente não teria se concretizado.

Agradeço às equipes multiprofissionais das enfermarias de clínica e cirurgia, do centro de terapia intensiva, unidade coronariana, unidade de transplante renal do HC FMRP-USP, unidade Campus, que participaram de maneira concreta e realista do cotidiano desse ensaio clínico.

Agradeço aos pacientes e seus familiares, todos eles, incluindo aqueles que não participaram, mas que de alguma forma, disponibilizaram seu tempo e suas realidades, partilhando suas vivências de angústias e esperança de um futuro com mais saúde e menos sofrimento.

Aos professores do Departamento de Medicina Social envolvidos nessa jornada pessoal, bem como aos secretários do Departamento, Paula Maria Pereira e Sérgio Carlos do Nascimento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

RESUMO

Heluany-Filho, Mário Augusto. Uso de simbiótico para descolonização de pacientes hospitalizados portadores de bacilos Gram-negativos multidrogarresistentes. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Nas últimas décadas, a incidência de infecções hospitalares causadas por bactérias Gram-negativas multidrogarresistentes (MDR) vem crescendo de maneira vertiginosa em todo o mundo, de modo que a Organização Mundial de Saúde (OMS) recentemente reconheceu essas infecções como uma preocupação mundial devido ao seu impacto negativo sobre as taxas de mortalidade intra-hospitalar e dos custos da assistência à saúde, afetando tanto os países desenvolvidos quanto os em desenvolvimento. Atualmente considera-se que a higienização das mãos, o uso racional de antimicrobianos e o isolamento de contato são as principais medidas disponíveis para contenção desse avanço. Porém, elas são apenas parcialmente efetivas e de implementação trabalhosa e onerosa. Assim, considera-se necessário o desenvolvimento de formas mais simples e eficientes para lidar com esse problema. No presente estudo, nos propusemos a avaliar o impacto da administração de um produto simbiótico a pacientes colonizados e/ou infectados por bactérias Gram-negativas MDR sobre as taxas de descolonização desses patógenos no trato digestivo. Trata-se de um ensaio clínico randomizado, duplamente cego, controlado com placebo, envolvendo 101 pacientes hospitalizados com colonização prévia por bactérias Gram-negativas MDR, demonstrada por meio de cultura seletiva de swab retal, cuja intervenção consistiu na administração oral ou enteral diária de 10^{10} unidades de *Lactobacillus bulgaricus* e 10^{10} unidades de *Lactobacillus rhamnosus* associados a fruto-oligossacarídeos durante (FOS) 7 dias. O desfecho primário do estudo foi a descolonização completa do trato digestivo posterior à intervenção, que, na análise do tipo “intenção de tratar modificada” foi de 16,7% (8/48) no grupo experimental e 20,7% (11/53) no grupo controle ($p=0,600$). Na análise “per protocol”, a descolonização completa do trato observada foi de 18,9% (7/37) no grupo experimental e 23,3% (7/30) no grupo controle ($p=0,659$). Em uma análise multivariada por meio de modelo de regressão logística o uso do simbiótico não influenciou significativamente o risco de descolonização completa do trato digestivo (OR= 0,80, IC 95%= 0,28-2,27, $p= 0,678$). A ocorrência de eventos adversos de natureza leve a moderada foi semelhante entre os grupos: 7,55% no grupo que utilizou placebo e 6,25% no grupo sob intervenção ($p= 1,000$). Nenhum evento adverso grave potencialmente relacionado às medicações de estudo foi observado. Nas condições estudadas, os dados obtidos pelo estudo nos levam à conclusão de que o simbiótico estudado demonstrou-se inefetivo na descolonização do trato digestivo de pacientes previamente colonizados por bactérias Gram-negativas MDR.

Palavras-Chave: Probiótico. Prebiótico. Simbiótico. Infecção hospitalar. Bacilos Gram-negativos Multidrogarresistentes. Pressão contra-seletiva

ABSTRACT

Heluany-Filho, Mário Augusto. **Use of a symbiotic product to decolonize patients harboring multidrug-resistant Gram-negative bacilli.** Master of Sciencethesis– Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

In recent decades the incidence of multidrug resistant (MDR) Gram-negative nosocomial infections has been dramatically raising in the whole world. The World Health Organization (WHO) recently recognized nosocomial infections due to MDR pathogens as a global concern due to its negative impact on patients, health-care workers and health-care institutions, affecting developed countries as well as developing ones. They negatively impact in-hospital mortality and health-care related costs. Hand hygiene promotion, antibiotic stewardship and contact precautions are the main available measures to control such MDR Gram-negative organisms in hospitals. However, they are only partially effective as well as difficult to be implemented and expensive. Therefore, simpler and more effective actions are thought to be helpful and urgent. In the present study, we analyzed the impact of the administration of a symbiotic product on patients harboring Gram-negative multidrug-resistant bacteria upon the subsequent rates of decolonization of these pathogens from the gastro-intestinal tract. This is a double-blinded and placebo controlled randomized clinical trial evaluating the oral/enteral daily administration of 10^{10} units of *Lactobacillus bulgaricus* plus 10^{10} units of *Lactobacillus rhamnosus* associated with fructo-oligosaccharide (FOS), or placebo, for 7 days, to 101 patients previously colonized by MDR Gram-negative bacteria, identified through selective culture of rectal swab. The primary study outcome was the rate of complete decolonization of the MDR microorganism from the gastro-intestinal tract following the intervention. In the “modified intention to treat” analysis, decolonization rates observed were 16.7% (8/48) in the experimental group and 20.7% (11/53) in the placebo group ($p=0,600$). In the “per protocol” analysis, decolonization rates were 18.9% (7/37) in the experimental group and 23.3% (7/30) in the placebo group ($p=0,659$). In a logistic regression model, symbiotic use did not produce any impact on the chance of decolonization ($OR=0.80$, $CI_{95\%}=0.28-2.27$, $p=0.678$). Mild to moderate adverse events occurred similarly in both the placebo (7.55%) and the experimental group (6.25%), ($p=1,000$). No severe adverse event potentially related to the medications was detected during the study period. In the present study conditions, the results obtained lead to the conclusion that the studied symbiotic proved to be ineffective to decolonize patients harboring multidrug resistant Gram-negative bacilli.

Keywords: Probiotic. Prebiotic. Symbiotic. Nosocomial infections. Gram-negative bacilli. Multidrug-resistant strains. Counter-selective pressure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Placa de cultivo microbiológico com o simbiótico e o placebo testado.....	28
-----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Critérios de multirresistência bacteriana adotados no estudo	26
Tabela 2-	Dados demográficos de base dos pacientes incluídos no grupo placebo e simbiótico	35
Tabela 3-	Local de internação dos pacientes incluídos nos grupos placebo e simbiótico.....	37
Tabela 4-	Bactérias Gram negativas MDR isoladas em cultura clínica antes da intervenção.....	38
Tabela 5-	Sítio de isolamento de bacilos Gram negativos MDR antes da intervenção.....	39
Tabela 6-	Uso de antimicrobianos nos grupos placebo e simbiótico durante a intervenção.....	40
Tabela 7-	Número de doses utilizadas de simbióticos ou placebo e via de administração	40
Tabela 8-	Taxas de descolonização de Gram-negativos MDR observadas durante o estudo nos grupos placebo e simbiótico, segundo o microorganismo colonizador na análise “intenção de tratar modificada” (ITT).....	41
Tabela 9-	Taxas de descolonização de Gram-negativos MDR observadas durante o estudo nos grupos placebo e simbiótico, segundo o microorganismo colonizador, na análise “per protocol”.....	42
Tabela 10-	Análise multivariada, por meio do modelo de regressão logística, dos fatores possivelmente associados à descolonização total do bacilo Gram negativos MDR no grupo “Intenção de tratar modificada” (n= 101)	42
Tabela 11-	Análise multivariada, por meio do modelo de regressão logística, dos fatores possivelmente associados à descolonização total do bacilo Gram negativos MDR no subgrupo “per protocol” (n= 67).....	43
Tabela 12-	Eventos adversos segundo a análise “intenção de tratar modificada” (ITT).....	43

LISTA DE SIGLAS

CCIH	Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CTI	Centro de Terapia Intensiva
DAC	Doença Coronariana Crônica
DP	Desvio Padrão
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
FAO	Food and Agriculture Organization
FOS	Fruto-oligossacarídeos
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC FMRP USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HIV/AIDS	Vírus da imunodeficiência humana/ Síndrome da imunodeficiência adquirida
IRA	Insuficiência Renal Aguda
IRC	Insuficiência Renal Crônica
ITT	Intenção de Tratar Modifica
ITU	Infecção do Trato Urinário
MDR	Multidrogarresistente
MRSA	<i>S. aureus</i> Meticilino-Resistentes
NEC	Neurocirurgia
NHSN	National Healthcare Safety Network
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAV	Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica
TSB	Caldo de Trypticaseina Soja
UCO	Unidade Coronariana
UPC	Unidade de Pesquisa Clínica
UTR	Unidade de Transplante Renal
VRE	Enterococcus faecium Resistente a Vancomicina
WHO	World and Health Organization

Sumário

1. INTRODUÇÃO	14
1.0 Introdução	15
2. Objetivos	22
2.1 Objetivo primário	23
2.2 Objetivo secundário	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.0 Materiais e Métodos	25
3.1 Delineamento do estudo	25
3.2 Local de estudo	25
3.3 Critérios de inclusão e exclusão	25
3.4 Aspectos éticos	27
3.5 Randomização e ocultamento da alocação	27
3.6 Assegurando a viabilidade dos Lactobacillus	28
3.7 Recrutamento, instrumento de busca e coleta de dados	29
3.8 Equipe envolvida e implementação do estudo	29
3.9 Tamanho amostral	30
3.9.1 Preparação e análise dos dados coletados	31
4. RESULTADOS	32
4.0 Resultados	33
4.1 Fluxograma de inclusão dos participantes no estudo.	34
4.2 Características de base dos pacientes incluídos	35
4.3 Dados referentes ao período de intervenção	39
5. DISCUSSÃO	44
5.0 Discussão	45
6. CONCLUSÕES	50
6.0 Conclusões	51
REFERÊNCIAS	52
REFERÊNCIAS*	53
ANEXOS	70
ANEXO A: Aprovação pelo Comitê de Ética	71
ANEXO B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	72

ANEXO C: Metodologia laboratorial de detecção de bacilo Gram-negativo multirresistente 75

ANEXO D: Ficha clínico microbiológica 81

1. INTRODUÇÃO

1.0 Introdução

Considerando a proporção estimada de células bacterianas para cada célula humana presente no organismo humano, podemos afirmar que o homem nasce 100% humano, mas morre 90% microbiano. Se na cavidade uterina o ser humano se desenvolve virtualmente livre de microrganismos, já no próprio parto se inicia um extenso processo de colonização por bactérias, que em poucos meses as conduzirá aproximadamente a uma proporção de 10:1 em relação ao número de células propriamente humanas, que persistirá mais ou menos estável por toda a vida extra-uterina. (SANTOS, 2004).

De fato, as bactérias são consideradas parte integral e essencial à vida na terra, sendo encontradas em todos os ambientes, por mais extremos que eles possam ser e também em associação com todos os seres vivos existentes no planeta. No ser humano, elas são encontradas de forma mais abundante na pele, e nos tratos respiratório, digestivo e genito-urinário, em uma diversidade que chega a mais de 1000 espécies diferentes conhecidas (SANTOS, 2004; QIN et al., 2010; ECKBURG et al., 2005; WANG et al., 2014).

Apesar de serem capazes de causar doença quando inoculadas em sítios corporais estéreis (corrente sanguínea, por exemplo), a imensa maioria dessas bactérias pratica uma relação de simbiose com o organismo humano, auxiliando a modulação do sistema imune, do metabolismo, provendo nutrientes e proteção contra microrganismos patogênicos extrínsecos à microbiota humana (SANTOS, 2004).

Essa relação eminentemente pacífica e mutuamente benéfica, no entanto, sofre relevante desequilíbrio quando o organismo humano é afetado por uma doença infecciosa. Isso porque, diante do advento dessas doenças, muitas vezes torna-se necessário o uso sistêmico de drogas antimicrobianas, que tem o potencial de romper o equilíbrio pré-existente entre o corpo humano e sua microbiota, criando uma oportunidade para a seleção ou aquisição externa de cepas bacterianas multidrogarresistentes (MDR). A multidrogarresistência foi definida como resistência adquirida a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al.; 2012).

O problema da resistência bacteriana adquirida, já descrito em praticamente todas as espécies de bactérias, iniciou-se concomitantemente à introdução e a ampla utilização dos antimicrobianos na prática clínica na década de 1950, expandindo-se a partir de 1960 com a introdução dos novos beta-lactâmicos, e agravando-se nas décadas de 1980 e 1990, com o surgimento de novas formas de resistência e a disseminação de germes MDR. Além do

emprego em medicina, contribui também de forma importante para a propagação da resistência bacteriana, a utilização de substâncias antimicrobianas em medicina veterinária, agricultura, e pecuária (BUU-HOI; GOLDSTEIN; ACAR, 1986; FEINMAN, 1998; LINTON, 1984; SAUNDERS, 1984; SUASSUNA; SUASSUNA, 1971; WITTE, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION SCIENTIFIC WORKING GROUP, 1983).

O acrônimo “ESKAPE” foi criado por Rice (2008), para destacar o nome dos patógenos mais resistentes e virulentos encontrados atualmente nos hospitais dos Estados Unidos e de forma semelhante nos demais países, a saber: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. (BOUCHER; COREY, 2008). No mais, foi exposto um acelerado aumento nas taxas de infecção acarretadas por *S. aureus* metilicina-resistentes (MRSA), *E. faecium* resistente à Vancomicina (VRE) e *Pseudomonas aeruginosa* resistente à fluorquinolonas, segundo os dados fornecidos pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2012).

Neste contexto, destacam-se os bacilos Gram-negativos MDR, como *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, que tem apresentado cepas com susceptibilidade reduzida à praticamente todas as drogas disponíveis para uso clínico. As opções terapêuticas são tão insuficientes que os médicos têm sido levados a utilizar drogas ultrapassadas, como por exemplo, a Polimixina B, criada em 1947, que devido à sua baixa eficácia e elevada toxicidade, teve seu uso descartado (FALAGAS; BLIZIOTIS, 2007; FALAGAS; KASIAKOU, 2005; SOULI; GALANI; GIAMARELLOU, 2008).

Uma das bactérias mais virulentas encontradas no âmbito hospitalar, *Klebsiella* spp. é parte da microbiota endógena do trato gastrointestinal humano, até mesmo da flora bucal. Das espécies patogênicas, a *K. pneumoniae* é a mais prevalente e de relevância clínica. Apesar de ser inerente à microbiota humana habitual, infecções por *K. pneumoniae* são rotineiramente contraídas por via hospitalar e mais frequentes nos pacientes imunodeprimidos. Estima-se que esse bacilo Gram-negativo seja responsável por 3 a 8% de todas as infecções bacterianas hospitalares ocorridas nos Estados Unidos da América (EUA), especialmente nas infecções do trato urinário, pneumonia e infecção primária de corrente sanguínea (PODSCHUN; ULMANN, 1998; SCHABERG; CULVER; GAYNES, 1991). Taxas de colonização por essa enterobactéria de 77% são observadas em pacientes hospitalizados, quando pesquisados por material fecal, 19% na faringe e 42% nas mãos, segundo Podschun e Ullmann (1998). O uso prévio de antibióticos está correlacionado com as elevadas taxas de colonização (ASENSIO et al., 2000; PODSCHUN; ULLMANN, 1998; POLLACK et al.,

1972). Pacientes colonizados tem a incidência de infecções nosocomiais por *Klebsiella* spp. quatro vezes maior, identificados por investigação fecal quando comparados com pacientes não colonizados (SELDEN et al., 1971). O uso prévio de antimicrobianos, presença de dispositivos invasivos, tais como sondas vesicais, cânulas endotraqueais e catéteres intravasculares são fatores de risco para infecções por *Klebsiella* spp de relevância significativa (ASENSIO et al., 2000; HANSEN; GOTTSCHAU; KOLMOS, 1998; PODSCHUN; ULMANN, 1998;).

Um bacilo Gram-negativo, de extrema importância atual como agente etiológico de infecções hospitalares em todo mundo, especialmente relevante no cenário da multirresistência bacteriana é o *Acinetobacter baumannii*. Tal bactéria detém a capacidade de adquirir inúmeros e concomitantes mecanismos distintos de resistência, ocasionando o aparecimento de cepas atualmente resistentes a quase todos os antibióticos disponíveis (LOLANS et al., 2006). National Healthcare Safety Network (NHSN) realizou um estudo em 2008, onde avaliou os patógenos Gram-negativos, mais frequentes causadores de infecções hospitalares em centros de terapia intensiva (CTI) (HIDRON et al., 2008). *Acinetobacter baumannii* foi responsável por 8,4% do total de pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV), 2,2% de infecções de corrente sanguínea relacionada à catéter intravascular, 1,2% de infecções do trato urinário relacionadas à sondagem vesical e 0,6% de infecções de sítio cirúrgico. Infecções por *A. baumannii* tendem a ocorrer em pacientes criticamente enfermos (MUNOZ-PRICE et al., 2013) e entre residentes de instituições de longa permanência, especialmente aquelas que albergam doentes dependentes de ventilação mecânica. Pós-operatório recente, presença de acesso venoso central, traqueostomia, ventilação mecânica, nutrição enteral e tratamento prévio com cefalosporinas de terceira geração, fluorquinolonas ou carbapenêmicos são fatores de riscos adicionais no paciente adulto (GARNACHO-MONTERO et al., 2005; MANIKAL et al., 2000; VILLERS et al., 1998). Surtos em diversos hospitais foram descritos nos Estados Unidos, Europa, América do Sul, África, Ásia e Oriente Médio (COELHO et al., 2006; LOLANS et al., 2006; MANIKAL et al., 2000; NAAS et al., 2006), sendo o patógeno muitas vezes identificado com a mesma origem monoclonal bacteriana sugerindo uma disseminação além de intra-hospitalar, inter-hospitalar, presumivelmente através da transferência de pacientes colonizados e/ou infectados e equipe de saúde comum a diversos ambientes de trabalho.

Um bacilo Gram-negativo não fermentador, *Pseudomonas aeruginosa*, também é identificado por seu potencial patogênico especialmente no âmbito hospitalar, onde é responsável por: 17% das pneumonias nosocomiais (2º agente mais comum), 7% das

infecções do trato urinário (ITU) (sendo o 3º agente mais prevalente), 8% das infecções de sítio cirúrgico (4º agente), 2% das infecções de corrente sanguínea (7º agente) e 9% das infecções dos outros sítios remanescentes (5º agente) (FAVERO et al., 1971; WARBUTON; BOWEN; KONKLE, 1994).

A indústria farmacêutica avançou e produziu novas classes de drogas antimicrobianas, incluindo antibióticos com novos mecanismos contra o desenvolvimento de resistência às opções terapêuticas iniciais por aproximadamente quatro décadas (de 1940 a 1970). Desde então, apenas três antibióticos (quinupristina-dalfopristina, linezolida e daptomicina), incluindo duas novas classes (oxazolidinonas e lipopeptídeo) estão no mercado para tratar infecções causadas por bactérias Gram-positivas MDR, enquanto apenas estudos preliminares avaliam a eficácia do antibiótico ceftazidima-avibactam frente a bactérias Gram-negativas MDR (CHOPRA et al., 2008).

No século 20 as intervenções tecnológicas prolongaram a expectativa de vida e aprimoraram a qualidade de vida da população, de modo significativo, concedendo recursos como cirurgias cardiovasculares, quimioterapia, implantes protéticos, transplantes, recursos estes que, para serem bem-sucedidos, requerem vigilância rigorosa e manejo eficaz de possíveis complicações infecciosas (WRIGHT, 2014). O aumento de pacientes submetidos a estes procedimentos intervencionistas (diagnósticos e terapêuticos) e o drástico crescimento da população geriátrica está elevando ainda mais o número de indivíduos imunodeprimidos, suscetíveis a internações hospitalares e, conseqüentemente, a infecções nosocomiais, em especial por patógenos MDR com suas devastas conseqüências (CHOPRA et al., 2008).

Para controlar a transmissão dos agentes MDR diversas medidas têm sido preconizadas, especialmente em unidades críticas como CTI e unidades de transplante. Podemos citar medidas administrativas, como adequado número de profissionais, laboratório de microbiologia competente e atualizado, higienização das mãos (técnica adequada e frequência necessária), o uso racional de antimicrobianos, retirada precoce dos dispositivos invasivos, máxima adesão às medidas de precaução de contato, higiene corporal com clorexidine a 2% e o uso de quarto privativo para populações específicas, utilização dos pacotes de medidas (bundles) já estabelecidos para prevenção de infecção por sítio corporal, além de treinamento continuado dos profissionais de saúde (CDC, 2012). Entretanto, evidências de muitas dessas intervenções são baseadas em estudos pequenos, quasi-experimentais e requerem educação continuada e adesão máxima de toda equipe multiprofissional envolvida no cuidado em saúde (DERDE et al., 2014).

A descolonização dos pacientes por bactérias MDR é uma iniciativa com potencial de redução da incidência de infecções hospitalares, uma vez que significativa porcentagem destes pacientes desenvolverá infecção pelos agentes MDR colonizadores. Estratégias baseadas na administração profilática de antibióticos (como descolonização seletiva gastrointestinal) poderiam ser propostas nesse contexto para prevenir infecções endógenas e exógenas e reduzir a mortalidade especialmente na população criticamente enferma. Muito embora a eficácia da descontaminação seletiva do trato gastrointestinal tenha sido confirmada por ensaios clínicos randomizados controlados e revisões sistemáticas (SILVESTRI; VAN SAENE; PETROS, 2012), ela permanece como uma medida controversa, devido à possibilidade de promoção ainda maior da resistência bacteriana com o uso continuado de agentes antimicrobianos por um largo contingente de pessoas. Nesse contexto, a emergência de novos métodos não dependentes de antibióticos, como a administração de simbióticos parece promissora.

Elie Metchnikoff, Há mais de um século, fez observações a respeito da longevidade da população búlgara (que fazia uso de iogurtes com bactérias ácido-láticas) se constituíram no fundamento do conceito de probióticos, reintroduzido 60 anos mais tarde, por Lilly e Stillwell. Probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como microrganismos viáveis, considerados não patogênicos para o ser humano que, quando administrados vivos por via oral ou enteral, em quantidades pré-definidas, podem produzir algum benefício clínico à saúde. Entre os mais estudados, podemos citar as bactérias do gênero *Lactobacillus* spp, *Bifidobacterium* e o fungo *Saccharomyces boulardii*, sendo que as primeiras são consideradas mais seguras, já que eventualmente *S. boulardii* pode causar fungemia (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO): WORLD AND HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2001; MILLAR et al., 1993).

Os probióticos possuem mecanismos de ação contra patógenos do trato gastrointestinal principalmente na competição por nutrientes e sítios de ligação, produção de metabólitos antimicrobianos, mudanças nas condições do ambiente, levando à redução da colonização intestinal bem como a translocação bacteriana e modulação da resposta imune do hospedeiro incluindo incremento da atividade fagocítica de neutrófilos e atividade citotóxica das células natural killers (TIEN; GIRARDIN, 2006).

Foi identificado através de duas meta-análises fundamentadas em sete e nove ensaios clínicos, que a suplementação neonatal de probióticos diminui a incidência de enterocolite necrotizante em pré-termos, diarreia, distensão abdominal e cólicas abdominais e proporciona a nutrição enteral completa mais precocemente (ALFALEH; BASSLER, 2008;

BIN-NUM et al., 2005; LI et al., 2004; MANZONI et al., 2006; MILLAR et al., 1993; WAGNER et al., 2000). Além dos efeitos acima mencionados, a administração de probióticos comprovadamente auxilia na prevenção de atopia em crianças (FOOLAD et al., 2013).

Roy e colaboradores (2014) realizaram um ensaio clínico, randomizado, duplo-cego, controlado com placebo que evidenciou significativa redução na colonização gastrointestinal por espécies de *Candida* entre pré-termos de baixo peso e extremo baixo peso que receberam probióticos além de comprovada redução nas taxas de infecção no grupo que recebeu probiótico bem como de sepse fúngica por *C. albicans* e *C. glabrata* comparado com grupo placebo (ROY et al., 2014).

Tais efeitos demonstram ser intercedidos pela interação do sistema imune com os probióticos, além do seu papel concorrente com alguns agentes patogênicos (LIN et al., 2005; RAUTAVA, 2007). Pode-se mencionar também, estudos clínicos com prósperos resultados de probióticos para prevenção de colite ulcerativa (BOHM; KRUIS, 2006), doença de crohn, em que o uso combinado de mesalazina com probiótico diminuiu a recorrência da doença após a cirurgia, quando confrontado com o grupo que foi tratado somente com antibiótico (CAMPIERI; GIONCHETTI, 1999). Evidenciamos ainda o arrefecimento da incidência de diarreia relacionada ao *Clostridium difficile* (HICKSON et al., 2007) especialmente na população idosa (PLUMMER et al., 2004).

A colonização de *Lactobacillus* na microbiota urogenital de mulheres saudáveis e a sua ausência em pacientes que desenvolvem ITU (SCHAEFFER; STAMEY, 1977; SEDDON et al., 1976; STAMEY, 1973), vaginose bacteriana e outras infecções genitais despertou o interesse no estudo dessa bactéria específica. Em geral, o uso de probióticos, especificamente de *Lactobacillus* recebeu grande atenção como uma alternativa natural e barata para restaurar e manter a saúde (CHANG, 1996; ELMER; SURAWICZ; McFARLAND, 1996; HAMILTON-MILLER, 1997; MCGROARTY, 1993; REID, 1996; SHALEV et al., 1996). Algumas espécies de *Lactobacillus*, dentre elas, GG e *rhamnosus*, aparentam ser eficazes na colonização e proteção da microbiota intestinal (BILLER et al., 1995; GORBACH; CHANG; GOLDIN, 1987; ISOLAURI et al., 1991; MILLAR et al., 1993; OKSANEN et al., 1990; SAXELIN; PESSI; SALMINEN, 1995; SIITONEN et al., 1990; WITTE, 1998) e urogenital (BRUCE; REID, 1988; BRUCE et al., 1992; HILTON; RINDOS; ISENBERG, 1995; REID; BRUCE; TAYLOR, 1995; REID; MILLSAP; BRUCE, 1994).

Gibson e Roberfroid, em 1995, introduziu o termo prebiótico para descrever suplementos alimentícios, mais especificamente, carboidratos não digeríveis, que podem ser benéficos ao hospedeiro através da estimulação seletiva da atividade e/ou do crescimento de

microrganismos presentes no trato gastrointestinal. Adicionalmente, o prebiótico pode inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995; MATTILA-SANDHOLM; MERCENIER, 2001; ROBERFROID, 2001). Esses componentes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora eles possam ter também algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado. Entre as substâncias prebióticas, destacam-se a lactulose, o lactitol, o xilitol, a inulina e alguns oligossacarídeos não digeríveis, como por exemplo, os fruto-oligossacarídeos (FOS). Os maiores efeitos benéficos dos prebióticos estão associados à otimização do metabolismo e funções do colón, como, por exemplo, na expressão ou mudança na composição de ácidos graxos de cadeia curta, aumento do peso fecal, redução do PH intestinal, aumento da expressão de proteínas de ligação e de certos biomarcadores do metabolismo lipídico e mineral e na modulação do sistema imune (BOURNET et al., 2002; FORCHIELLI; WALKER, 2005; QIANG; YOUNGLIE; QIANBING, 2009).

Pode-se definir como simbiótico, aquele produto que é combinado por um probiótico e um prebiótico. A hipótese principal que subsidia o presente estudo é a de que a administração de um produto simbiótico possa, de maneira competitiva, eliminar ou reduzir a concentração intestinal de bacilos Gram-negativos MDR, em pacientes colonizados por esses agentes. Essa medida, se efetiva, poderia reduzir as possibilidades de transmissão do patógeno MDR em questão, como também diminuir a propensão do próprio paciente para o desenvolvimento de infecções hospitalares, notadamente do trato respiratório e urinário. Até o presente momento, não temos conhecimento de estudo clínico que tenha avaliado essa hipótese.

Com essa hipótese, desenvolvemos um estudo piloto para identificação dos microrganismos probióticos potencialmente eficazes a serem usados, dentre aqueles comercialmente disponíveis no Brasil, selecionando assim as espécies *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus bulgaricus* para o ensaio clínico definitivo (COELHO et al., 2013).

2. OBJETIVOS

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo primário

- ✓ Avaliar o impacto da administração do simbiótico em estudo, composto por 10^{10} unidades de *Lactobacillus rhamnosus*, 10^{10} unidades de *Lactobacillus bulgaricus* e fruto-oligossacarídeo, sobre as taxas de descolonização de bacilos Gram-negativos MDR no trato gastro-intestinal de pacientes internados e previamente colonizados por esses agentes.

2.2 Objetivo secundário

- ✓ Avaliar a incidência de eventos adversos relacionados à administração do simbiótico em estudo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.0 Materiais e Métodos

3.1 Delineamento do estudo

Trata-se de um ensaio clínico randomizado, duplo cego e controlado com placebo. Adotamos randomização simples, com a qual os participantes foram colocados diretamente nos grupos de estudo e controle, de forma não-estratificada.

3.2 Local de estudo

O estudo foi desenvolvido no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP- USP). Esta é uma instituição pública que possui 713 leitos ativos, distribuídos entre 29 especialidades médicas, e 6 unidades de terapia intensiva, focadas na assistência em neonatologia, pediatria geral, cardiologia clínica, cirurgia torácica, neurocirurgia e cuidado geral de adultos. A instituição é considerada referência na assistência à saúde em nível terciário para uma população de aproximadamente 3 milhões de habitantes vivendo ao redor de Ribeirão Preto. O HCFMRP-USP possui laboratório de microbiologia próprio, o qual processa aproximadamente 8000 amostras clínicas por mês para bactérias aeróbias e anaeróbias, além de pesquisa de fungos e BAAR oriundas de pacientes internados e em regime ambulatorial.

Para uniformizar de forma adequada a coleta e o transporte de material clínico para cultura, o hospital disponibiliza, em sua rede interna de microcomputadores um manual com instruções específicas para cada material a ser colhido.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão adotados foram: pacientes adultos, internados nas enfermarias das especialidades clínicas e cirúrgicas do HCFMRP- USP, com pelo menos uma

cultura clínica com qualquer espécie de bactéria Gram-negativa multirresistente isolada pelo laboratório de microbiologia do serviço além de, swab retal contendo o mesmo perfil bacteriano, ou seja, bactéria Gram-negativa multirresistente, identificada por técnica conforme recomendação do CDC vista no anexo C.

Foram considerados critérios de exclusão a presença de doença abdominal obstrutiva ou perfurativa, gestação tópica com feto vivo e imunossupressão grave, como aquela produzida por neoplasia hematológica, infecção avançada pelo HIV/AIDS com CD4 <200 ou uso de imunossupressores com repercussão hematológica ou em doses elevadas. Foram excluídos da pesquisa pacientes com as referidas condições clínicas acima citadas pelo risco potencial de translocação bacteriana a partir do trato digestivo para a corrente sanguínea.

O conceito de multirresistência utilizado baseou-se no critério estabelecido pela Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) do referido hospital, como descrito a seguir.

Tabela 1. Critérios de multirresistência bacteriana adotados no estudo.

Bactéria	Resistente à
<i>Klebsiella</i> sp <i>E. coli</i>	Cefotaxima ou Ceftazidima ou Ceftriaxona ou Aztreonam ou Cefepime ou Imipenem ou Ertapenem ou Meropenem ou Polimixina
<i>Citrobacter</i> spp <i>Enterobacter</i> spp <i>Serratia</i> spp <i>Proteus</i> spp <i>Providencia</i> spp <i>Morganella morganii</i>	(Ceftriaxona e Amicacina e Ciprofloxacina) ou Cefepime ou Imipenem ou Ertapenem ou Meropenem ou Polimixina
<i>Burkholderia cepacia</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Todas as amostras
<i>Acinetobacter</i> sp	Ampicilina-Sulbactam ou Imipenem ou Meropenem ou Polimixina (Ceftazidima e Amicacina e Ciprofloxacina)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Imipenem ou Meropenem ou Polimixina (Ceftazidima e Amicacina e Ciprofloxacina)

3.4 Aspectos éticos

Esse ensaio clínico foi projetado de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC FMRP-USP, processo HCRP nº 13914/2011, na data de 06/02/2012, conforme demonstrado no anexo A.

Além de preencher os critérios de inclusão acima descritos, foi exigida a assinatura do termo de consentimento dos candidatos elegíveis ou de seus responsáveis legais, no caso de pacientes com perturbação do nível de consciência, após serem devidamente esclarecidos sobre a natureza e objetivos da pesquisa, através de um “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido”, que pode ser visualizado no anexo B, bem como de forma verbal pelos próprios pesquisadores.

A confidencialidade das informações dos pacientes foi preservada, uma vez que as análises de dados foram feitas de forma agrupada, e desvinculada da identificação dos participantes.

3.5 Randomização e ocultamento da alocação

Foi realizada uma randomização simples dos pacientes para receber um sachê de simbiótico, duas vezes ao dia, durante sete dias, contendo os probióticos *L.bulgaricus* e *L.rhamnosus*, 10 bilhões de unidades de cada um, associados a fruto-oligossacarídeo (FOS) e excipiente, constituído de 1% de estearato de magnésio e 99% de lactose, ou a mesma posologia de um sachê placebo contendo apenas o excipiente. Os sachês apresentavam exatamente a mesma embalagem e rótulo e seu conteúdo apresentava o mesmo aspecto, peso e odor, assegurando o desconhecimento de seu conteúdo à equipe de pesquisa e pacientes envolvidos, garantindo o caráter duplo cego do estudo.

A randomização foi realizada pela farmacêutica responsável pela confecção dos simbióticos e do placebo, não envolvida na alocação dos pacientes bem como em qualquer outra etapa da pesquisa. No rótulo dos sachês, além da posologia, constava apenas o número do tratamento, sendo que a codificação dos números de placebo e simbiótico foi entregue, em

envelope fosco, lacrado pela farmacêutica, ao orientador que, apenas ao término da alocação de todos os pacientes, abriu o envelope e tomou conhecimento da referida codificação.

A alocação nos grupos, controle e intervenção, foi feita de maneira cega, pela pesquisadora colaboradora do projeto, sendo que os pacientes foram incluídos seguindo exatamente a sequência numérica crescente do número 1 ao número 116.

3.6 Assegurando a viabilidade dos *Lactobacillus*

Quando o recrutamento dos pacientes foi finalizado, alguns sachês não utilizados pelos pacientes incluídos foram enviados ao laboratório de microbiologia associado à pesquisa para testar a viabilidade de seu conteúdo. O microbiologista semeou em placas de cultura o conteúdo do sachê constituído de placebo, onde não foi evidenciado crescimento de nenhum agente microbiológico, bem como de simbiótico, com crescimento bacteriano conforme o esperado e demonstrado na figura abaixo.

Figura 1. Placa A evidenciando crescimento de microrganismo onde foi semeado sachê com o simbiótico testado, constituído de *Lactobacillus rhamnosus* e *L. bulgaricus* e placa B onde foi semeado sachê contendo apenas placebo.

3.7 Recrutamento, instrumento de busca e coleta de dados

A partir dos resultados obtidos com o projeto piloto, iniciou-se o ensaio clínico definitivo com a inclusão de pacientes de agosto de 2012 a dezembro de 2013. Ressalta-se que, também no projeto piloto, foram utilizados os mesmos critérios de inclusão, exclusão e exigida a assinatura do mesmo Termo de Consentimento.

A busca pelos pacientes candidatos à pesquisa foi realizada através do sistema informatizado de resultados de culturas positivas disponíveis para a CCIH do HCFMRP-USP Campus.

Uma ficha clínico-microbiológica foi estruturada como instrumento de coleta das variáveis de interesse para posterior análise dos dados e desfechos observados (Anexo D). Os dados utilizados para seu preenchimento foram o prontuário médico do paciente e os resultados obtidos no laboratório de microbiologia.

3.8 Equipe envolvida e implementação do estudo

A busca ativa e a inclusão dos pacientes foi realizada pelas enfermeiras e equipe médica da CCIH do HCFMRP- USP. A administração dos sachês bem como a coleta dos swabs retais foi realizada por técnicos de enfermagem e enfermeiros da Unidade de Pesquisa Clínica (UPC) do HC FMRP-USP. A UPC faz parte da Rede Nacional de Pesquisas Clínicas (RNPC) e participa dos estudos cooperativos nacionais patrocinados pelo Departamento de Ciência e Tecnologia do Ministério da Saúde. Sua missão é fornecer suporte para que pesquisas em seres humanos realizados no âmbito do HCFMRP-USP estejam em conformidade com as normas nacionais e internacionais de Boas Práticas em Pesquisa Clínica.

Estabeleceu-se que a administração dos sachês fosse feita preferencialmente por via oral, caso não houvesse contra-indicação para a escolha dessa via, com a orientação de realizar um bochecho da solução antes da deglutição com objetivo de colonizar o trato gastrointestinal a partir da cavidade oral. Caso a via oral fosse contraindicada, os sachês seriam então administrados por via enteral. Cada sachê foi diluído em 10 ml de água filtrada, administrado em duas doses diárias, sendo uma pela manhã e a outra, aproximadamente, 8 horas após a primeira dose, durante sete dias.

Para a coleta de material fecal foram utilizados swabs estéreis, com haste flexível, sem meio de transporte, introduzidos aproximadamente 1 a 2 cm do esfíncter retal, realizando movimento rotacional e assegurando material de coloração fecal no algodão do swab após a coleta. Imediatamente após a realização do exame, os swabs eram encaminhados ao laboratório de microbiologia do HCFMRP-USP para serem processados exclusivamente pelo pesquisador principal do estudo.

No laboratório, as amostras de swab retal encaminhadas para detecção de bactérias MDR foram inoculadas em 5 ml de caldo TSB acrescido de um disco de ertapenem 10 mcg/ml e 5 ml de caldo TSB acrescido de cefotaxima 30 mcg/ml. Os caldos foram incubados em estufa a 35°C por 18 a 24 horas e posteriormente semeados 100 µl em Agar MacConkey (BioMeriëux) acrescido de um disco de Ertapenem 10µg/ml e um disco de cefotaxima 30µg/ml, com intuito de selecionar bactérias Gram-negativas MDR.

As amostras foram incubadas em estufa a 35°C por 18 a 24 horas e, na vigência de crescimento bacteriano, dentro do halo de inibição, colônias isoladas foram retiradas para identificação de gênero e espécie por meio de cartões específicos para bacilos Gram-negativos do sistema automatizado Vitek II[®] (Biomérieux). Também o teste de susceptibilidade a antimicrobianos foi realizado neste sistema para as drogas ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefazolina, cefuroxima, ceftriaxona, ceftazidima, aztreonam, cefepime, gentamicina, amikacina, ciprofloxacina, levofloxacina, meropenem, nitrofurantoína, piperacilina, piperacilina/tazobactam e sulfametoxazol/trimetoprim. A interpretação dos testes de susceptibilidade, realizada pelo sistema automatizado ou visualmente pelo microbiologista, foi baseada nas normas vigentes do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI).

O controle de qualidade dos discos de antibióticos e dos meios utilizados, foi realizado de acordo com CLSI guideline documents M2 e M100.

Todas as cepas isoladas foram armazenadas em TSB + 20% de glicerol a -70°C para possíveis análises futuras genóticas e fenóticas.

3.9 Tamanho amostral

Considerando que a probabilidade de ocorrer descolonização espontânea da bactéria Gram-negativa MDR no trato gastro-intestinal durante a internação seja em torno de

10%, (dados da CCIH do HCFMRP-USP Campus, não publicados) e a expectativa de que os simbióticos possam elevar essa taxa para 40% dos pacientes colonizados, estimamos a necessidade de incluir 39 pacientes por grupo, tendo um nível de significância (α) de 5% e um poder do teste ($1-\beta$) de 90%. Considerando possíveis perdas, planejamos incluir 116 pacientes no estudo.

3.9.1 Preparação e análise dos dados coletados

As informações colhidas foram tabuladas em um banco de dados do programa Excel (Windows 2000) e analisadas do ponto de vista estatístico no programa STATA[®] (versão 9.0). O desfecho primário do estudo foi a taxa de descolonização de Gram-negativos MDR do trato gastro-intestinal, isto é, a obtenção de uma cultura em swab retal negativa para bacilos Gram-negativos MDR após a realização do tratamento experimental ou placebo. Foram considerados como casos em que se obteve descolonização parcial, aqueles em que se detectou cultura de swab retal negativa para o bacilo Gram-negativo MDR originalmente presente no trato gastro-intestinal do paciente, porém, que apresentou resultado positivo para outra espécie de bacilo Gram-negativo MDR.

O desfecho primário do estudo foi avaliado de duas maneiras distintas. Na primeira, analisamos os dados de todos os pacientes randomizados e que utilizaram pelo menos 4 doses do produto experimental ou placebo, população essa denominada “intenção de tratar modificada”. Na segunda análise, incluímos somente os dados referentes aos pacientes que concluíram o protocolo de 1 semana, subpopulação essa denominada “per protocol”.

Foram utilizados o teste do qui-quadrado, com a correção de Pearson, e o Teste exato de Fisher bicaudal para estudar possíveis associações entre a ocorrência de descolonização completa ou parcial e as variáveis categóricas demográficas, clínicas e microbiológicas avaliadas. Já as variáveis contínuas tiveram sua associação com os desfechos, estudadas por meio da aplicação do Teste de Wilcoxon.

Para avaliar a interferência de possíveis fatores de confusão na determinação do desfecho primário do estudo, construímos um modelo de regressão logística, tendo como variáveis independentes: sexo, idade, alocação no estudo e o tempo prévio de internação, como um marcador indireto da gravidade da doença de base.

4. RESULTADOS

4.0 Resultados

O diagrama abaixo evidencia que 275 pacientes com cultura clínica positiva para bacilo Gram-negativo MDR foram triados por swab retal, sendo que 156 deles foram excluídos por não apresentarem swab retal positivo para bacilo Gram-negativo MDR. Nove pacientes do grupo simbiótico e seis do grupo placebo descontinuaram a intervenção, sendo as razões de descontinuação: óbito ou alta hospitalar precoce, ou seja, antes de terminar os sete dias de medicação e colher o primeiro swab retal após a intervenção. Em nenhum dos grupos houve abandono do estudo por ocorrência de eventos adversos relacionados à medicação avaliada.

Dos 48 pacientes analisados, que utilizaram simbiótico, 37 tomaram as 14 doses prescritas e dos 53 pacientes do grupo placebo, 30 utilizaram todos os sachês, representando na avaliação subsequente a análise “per protocol”. Foram incluídos na análise “intenção de tratar modificada” todos os pacientes que tomaram pelo menos 4 sachês de simbiótico ou placebo, totalizando 48 pacientes no grupo experimental e 53 no grupo controle.

4.1 Fluxograma de inclusão dos participantes no estudo.

4.2 Características de base dos pacientes incluídos

Na tabela 2 podemos observar alguns dados demográficos e clínicos. Nota-se que o sexo feminino constituiu aproximadamente 32% dos pacientes incluídos no grupo placebo e 48% do grupo intervenção. A idade média dos indivíduos incluídos em ambos os grupos foi de 58 anos. Podemos observar em ambos os grupos, proporções muito semelhantes de pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), 13,2% e 12,5% nos grupos placebo e simbiótico, respectivamente, e diferentes em relação à diabetes mellitus, tendo uma maior percentagem de diabéticos no grupo placebo. Pelo menos 50% dos pacientes em ambos os grupos possuíam Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e Insuficiência Renal Aguda (IRA) ou Insuficiência Renal Crônica (IRC). Chama a atenção a elevada porcentagem em ambos os grupos de pacientes portadores de alguma infecção no momento da inclusão no estudo, 75,4% e 77% nos grupos placebo e simbiótico, respectivamente.

Tabela 2. Dados clínicos demográficos de base dos pacientes incluídos nos grupos placebo e simbiótico.

Variável	Grupo Placebo*		Grupo Simbiótico*	
	(n=53)	%	(n=48)	%
Sexo Feminino	17	32,1	23	47,9
Diabetes mellitus	17	32,1	7	14,6
Desnutrição	7	13,2	2	4,2
DPOC	7	13,2	6	12,5
HAS	31	58,5	24	50,0
Doença Coronariana Crônica (DAC)	10	18,9	7	14,6
Doença Auto - Imune	1	1,9	4	8,3
IRA ou IRC	28	52,8	24	50,0
Obesidade	8	15,1	9	18,7
Neoplasia	13	24,5	11	22,9
Infecções	40	75,5	37	77,1
Idade $\pm$ DP (anos)	58 $\pm$ 18,4		58 $\pm$ 17,32	
Tempo de internação prévio $\pm$ DP(dias)	34 $\pm$ 26,7		33 $\pm$ 20,9	

* Os dados das variáveis categóricas são n(%), enquanto que para as variáveis contínuas trata-se da média $\pm$ desvio padrão (DP).

Observamos na tabela 3 que, dentre as unidades críticas, a unidade de transplante renal (UTR) alojou a maior proporção de pacientes, com 14 dos 101 pacientes incluídos, representando 13,86% do total, seguido pelo CTI, com 7 pacientes, correspondendo a 6,93% do número absoluto. Já nas enfermarias podemos observar que a ortopedia foi a unidade com a maioria das inclusões, com 13 de 101 pacientes, correspondendo a 12,87%, seguida pela enfermaria de nefrologia, com 8 pacientes, representando 7,92%.

Tabela 3. Local de internação dos pacientes incluídos nos grupos placebo e simbiótico.

Local de Internação	Grupo Placebo (n= 53)		Grupo Simbiótico (n= 48)		Total de pacientes (n= 101)
	n	%	n	%	
Unidades críticas					
Unidade Coronária (UCO)	4	7,5	-	-	4
CTI adulto	4	7,5	3	6,2	7
Semi-intensivo Neurocirurgia (NEC)	1	1,9	3	6,2	4
Unidade metabólica	1	1,9	2	4,2	3
Unidade de transplante hepático	1	1,9	4	8,3	5
UTR	6	11,3	8	16,7	14
Enfermarias					
Nefrologia	5	9,4	3	6,2	8
Pneumologia	1	1,9	2	4,2	3
Infectologia	3	5,7	3	6,2	6
Neurologia	-	-	1	2,1	1
Imunologia	-	-	2	4,2	2
Dermatologia	-	-	1	2,1	1
Cardiologia	-	-	1	2,1	1
Oftalmologia	-	-	1	2,1	1
Geriatria	2	3,8	2	4,2	4
Oncologia	1	1,9	1	2,1	2
Otorrinolaringologia	1	1,9	-	-	1
Gastroenterologia	-	-	3	6,2	3
Clínica Civil	1	1,9	1	2,1	2
Vascular	1	1,9	2	66,7	3
Cabeça e pescoço	1	1,9	-	-	1
Gastrocirurgia	6	11,3	-	-	6
Ortopedia	9	16,9	4	30,8	13
Urologia	4	7,5	1	2,1	5
Proctologia	1	1,9	-	-	1

Klebsiella spp. foi a bactéria mais identificada em culturas clínicas, respondendo por aproximadamente 40% e 45% dos isolados de cultura nos grupos placebo e intervenção, respectivamente, seguida por *Acinetobacter baumannii*, segunda bactéria mais isolada em ambos os grupos e por *Pseudomonas aeruginosa*, terceira mais prevalente. *Proteus* sp. e outros Gram-negativos não fermentadores, como por exemplo *Burkholderia* spp e

Stenotrophomonas spp. foram as espécies menos encontradas, conforme descrito na tabela 4. A grande maioria dessas bactérias identificadas nas culturas supracitadas foi responsável por algum tipo de infecção na população estudada antes da intervenção, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4. Bactérias Gram-negativas MDR isoladas em cultura clínica antes da intervenção.

Isolamento Microbiológico antes da Intervenção	Grupo Placebo (n=53)		Grupo Simbiótico (n=48)	
	n	%	n	%
<i>Klebsiella spp.</i>	21	39,6	22	45,8
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	32,1	12	25,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	15,1	6	12,5
<i>Enterobacter spp.</i>	4	7,5	3	6,2
<i>Proteus spp.</i>	1	1,9	1	2,1
<i>Serratia spp.</i>	-	-	1	2,1
Outros bacilos Gram-negativos fermentadores	6	11,3	4	8,3
Outros bacilos Gram-negativos não fermentadores	1	1,9	1	2,1
Agente causando doença clínica	38	71,7	35	72,9

Observamos na Tabela 5 que urocultura foi a cultura clínica responsável por praticamente 50% dos isolamentos de bactérias Gram-negativas MDR nos dois grupos. Ferida cirúrgica foi o sítio responsável por aproximadamente um quarto dos isolados ocupando a posição de segundo sítio mais prevalente nos dois grupos de estudo.

Tabela 5. Sítio de isolamento de bacilos Gram-negativos MDR antes da intervenção.

Sítio de Isolamento	Grupo Placebo (n=53)		Grupo Simbiótico (n=48)	
	n	%	n	%
Urocultura	26	49,0	25	52,1
Ferida Cirúrgica	13	24,5	12	25,0
Hemocultura	9	16,9	3	6,2
Trato Respiratório	7	13,2	6	12,5
Pesquisa de Vigilância	3	5,7	3	6,2
Líquido Peritoneal	-	-	1	2,1

4.3 Dados referentes ao período de intervenção

A tabela 6 evidencia que a imensa maioria dos pacientes incluídos, mais que 70%, utilizou antibióticos durante o período de intervenção, lembrando que, coube à equipe médica responsável pelo paciente, o diagnóstico de infecção e a decisão sobre o uso dos antimicrobianos, não tendo interferência dos pesquisadores envolvidos. Polimixina e carbapenêmicos foram as duas classes de antibióticos mais utilizados em ambos os grupos, evidenciando a alta complexidade das situações clínicas dos doentes internados em um hospital terciário como o HCFMRP - USP, tanto nas unidades de cuidado de pacientes criticamente enfermos, como CTI, UCO, UTR como em unidades de pacientes mais estáveis como nas enfermarias de clínica e cirurgia.

Tabela 6. Uso de antimicrobianos nos grupos placebo e simbiótico durante a intervenção.

	Grupo Placebo (n=53)		Grupo Simbiótico (n=48)	
	n	%	n	%
Uso de antibióticos	43	81,1	35	72,9
Carbapenêmicos	17	32,1	12	25,0
Polimixina	13	24,5	12	25,0
Cefalosporinas	9	16,9	2	4,2
Quinolonas	8	15,1	6	12,5
Outros antibióticos	3	5,7	4	8,3
Inibidor β -lactamase	1	1,9	4	8,3

Na tabela 7 podemos observar que o número de doses checadas em prescrição pela equipe de enfermagem que administrou a medicação, foi muito semelhante em ambos os grupos, aproximadamente 12 e 13 sachês pelos grupos placebo e simbiótico, respectivamente. Observa-se que 66,04% dos pacientes no grupo placebo e 56,25% no grupo experimental receberam o excipiente, por via oral.

Tabela 7. Número de doses utilizadas de simbiótico ou placebo e via de administração.

	Grupo Placebo* (n= 53)		Grupo Simbiótico* (n= 48)	
	n	%	n	%
Administração via oral	35	66,0	26	56,2
Administração via enteral	18	33,9	21	43,7
Nº doses checadas em prescrição $\pm$ Desvio Padrão (DP)	12,2 $\pm$ 2,7		13,1 $\pm$ 1,9	

* Os dados das variáveis categóricas são n(%), enquanto que para as variáveis contínuas trata-se da média $\pm$ desvio padrão (DP).

Na Tabela 8, encontra-se descrito o desfecho primário do estudo, quais sejam as taxas de descolonização de Gram-negativos MDR observadas nos grupos placebo e

simbiótico, segundo o microorganismo colonizador, na análise do tipo “intenção de tratar modificada” (ITT). As taxas de descolonização parcial observadas foram também bastante semelhantes em ambos os grupos: 22,6% (12/53) no grupo placebo, contra 37,5% (18/48) no grupo simbiótico ($p=0,103$).

Tabela 8. Taxas de descolonização de Gram-negativos MDR observada durante o estudo nos grupos placebo e simbiótico, segundo o microorganismo colonizador, na análise “intenção de tratar modificada”.

Bacilo Gram-negativo MDR	Grupo Placebo (n= 53)		Grupo Simbiótico (n= 48)		Valor de p*
	n/n [#]	%	n/n [#]	%	
<i>Klebsiella</i> spp.	7/21	33,3	3/22	13,6	0,162
<i>Enterobacter</i> spp.	0/4	-	1/3	33,3	0,429
Enterobactérias agrupadas	8/32	25,0	6/31	19,4	0,763
<i>Acinetobacter baumannii</i>	4/17	23,5	0/12	-	0,121
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/8	-	2/6	33,3	0,165
Não-fermentadores agrupados	4/24	16,7	2/19	10,5	0,678
Todos agrupados	11/53	20,7	8/48	16,7	0,600

* Segundo o Teste do Qui-quadrado corrigido por Pearson ou Teste Exato de Fisher bicaudal.

[#] Número de pacientes descolonizados/número de pacientes previamente colonizados (percentual)

Na Tabela 9, encontram-se descritas as taxas de descolonização de Gram-negativos MDR observadas nos grupos placebo e simbiótico segundo o microorganismo colonizador, na análise do tipo “per protocol”. As taxas de descolonização parcial observadas neste mesmo subgrupo foram também bastante semelhantes em ambos os grupos: 22,7% (8/30) no grupo placebo, contra 29,7% (11/37) no grupo simbiótico ($p=0,782$).

Tabela 9. Taxas de descolonização de Gram-negativos MDR observadas durante o estudo nos grupos placebo e simbiótico, segundo o microrganismo colonizador, na análise “per protocol”.

Bacilo Gram-negativo MDR	Grupo Placebo (n= 30)		Grupo Simbiótico (n= 37)		Valor de p*
	n/n [#]	%	n/n [#]	%	
<i>Klebsiella</i> spp.	6/14	42,8	2/15	13,3	0,109
<i>Enterobacter</i> spp.	0/3	-	1/3	33,3	1,000
Enterobactérias agrupadas	7/21	33,3	5/24	20,8	0,501
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0/6	-	0/9	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0/4	-	2/5	40,0	0,444
Não-fermentadores agrupados	0/10	-	2/14	14,3	0,493
Todos agrupados	7/30	23,3	7/37	18,9	0,659

* Segundo o Teste do Qui-quadrado corrigido por Pearson ou Teste Exato de Fisher bicaudal.

[#] Número de pacientes descolonizados/número de pacientes previamente colonizados (percentual)

Nas Tabelas 10 e 11 são apresentadas as análises multivariadas empregadas respectivamente nos grupos “intenção de tratar modificada” e “per protocol” para identificar possíveis fatores associados à descolonização total dos bacilos Gram-negativos MDR presentes à inclusão no estudo.

Tabela 10. Análise multivariada, por meio de modelo de regressão logística, dos fatores possivelmente associados à descolonização total do bacilo Gram-negativo MDR, no grupo “intenção de tratar modificado” (n=101).

	Odds Ratio	IC 95%	Valor de p
Sexo	1,34	0,45 – 4,01	0,599
Idade	0,98	0,96 – 1,01	0,340
Tempo de internação prévio	0,98	0,95 – 1,00	0,148
Uso do simbiótico	0,80	0,28 – 2,27	0,678

Tabela 11. Análise multivariada, por meio de modelo de regressão logística, dos fatores possivelmente associados à descolonização total do bacilo Gram-negativo MDR, no subgrupo “per protocol” (n=67)

	Odds Ratio	IC 95%	Valor de p
Sexo	1,10	0,31 – 3,96	0,879
Idade	0,99	0,95 – 1,03	0,624
Tempo de internação prévio	0,97	0,93 – 1,01	0,115
Uso do simbiótico	0,79	0,23 – 2,75	0,715

O estudo demonstrou que os *Lactobacillus rhamnosus* e *bulgaricus* associados a fruto-oligossacarídeos são seguros e não foram encontrados eventos adversos significativos associados ao seu uso, conforme demonstrado na tabela 12.

Tabela 12. Eventos adversos segundo a análise “intenção de tratar modificada” (ITT).

	Grupo Placebo (n=53)		Grupo Simbiótico (n=48)		Valor de p*
	n	%	n	%	
Eventos Adversos	4	7,5	3	6,2	1.000
Diarréia	2	3,8	1	2,1	1.000
Náuseas	-	-	1	2,1	0,470
Vômitos	-	-	2	4,2	0,218
Cólica abdominal	-	-	1	2,1	0,470
Flatulência	-	-	1	2,1	0,470
Gosto ruim	-	-	-	-	-
Bacteremia por <i>Lactobacillus</i>	-	-	-	-	-
Outros	2	3,8	-	-	-

* Segundo o teste exato de Fisher

5. DISCUSSÃO

5.0 Discussão

Em nosso conhecimento, este é o primeiro ensaio clínico que avaliou o impacto da utilização de simbióticos sobre a descolonização de bacilos Gram-negativos MDR, a fim de encontrar novas formas de combate deste crescente problema mundial. Considerando que os probióticos podem efetivamente colonizar o trato gastrointestinal humano e competir com outras bactérias patogênicas por nutrientes e espaço (REID, 2016), criamos a hipótese de que eles poderiam descolonizar pacientes hospitalizados portadores de bactérias Gram-negativas MDR. De fato, em um pequeno estudo piloto, encontramos resultados promissores utilizando cepas de *Lactobacillus* (COELHO, et al. 2013).

Nas condições estudadas, os dados desse estudo demonstram claramente que o produto simbiótico aqui utilizado, composto por 10^{10} unidades de *Lactobacillus bulgaricus* e 10^{10} unidades de *Lactobacillus rhamnosus* associados a fruto-oligosacarídeos, não foi mais efetivo do que o placebo para a descolonização do trato gastro-intestinal de pacientes hospitalizados portadores de bacilos Gram-negativos MDR. Essa inefetividade foi consistentemente demonstrada nas análises estatísticas uni e multivariada, e nas subpopulações “intenção de tratar modificada” e “per protocol”.

Os bacilos Gram-negativos MDR são considerados hoje uma importante ameaça à saúde pública global, considerando sua incidência crescente em todo o mundo e sua capacidade de causar processos infecciosos graves e ameaçadores da vida, resistindo à terapêutica antimicrobiana de mais amplo espectro disponível (PATERSON, D; BENJAMIM, A, 2010). A preocupação para com esse problema superou os limites do setor saúde, como demonstrado recentemente pelo “Relatório Anual sobre Riscos Globais” do Fórum Econômico Mundial em 2013, que classificou o problema da resistência bacteriana como um dos maiores riscos iminentes à segurança da economia global (HOWELL, L. et al. 2013).

As bactérias MDR mais identificadas nas culturas clínicas, deste estudo, foram *Klebsiella pneumoniae* (42,57%), seguida por *Acinetobacter baumannii* (28,71%) e por *Pseudomonas aeruginosa* (13,86%), semelhante aos dados obtidos em outro estudo, realizado por MAGIORAKOS e colaboradores (2012), onde *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* encontram-se entre as bactérias mais identificadas, evidenciando um aumento da incidência de patógenos virulentos e resistentes à maioria dos antibióticos em uso.

Pacientes que são infectados por patógenos MDR, muitas vezes tem um risco aumentado do prolongamento do tempo de internação e da mortalidade. Os custos com o

cuidado clínico destes pacientes podem ser maiores que o dobro em comparação com aqueles não infectados. Um estudo realizado por BASAKI, et al. (2015) em um hospital terciário indiano, evidenciou um aumento da incidência de bactérias MDR, onde das 137 cepas analisadas, 97 eram resistentes aos carbapenêmicos e 100% sensíveis a polimixina. Os carbapenêmicos e a polimixina foram as duas classes de antibióticos mais utilizados, em nosso estudo, 28,71% e 24,75% respectivamente, evidenciando a alta complexidade das internações.

Os números do presente estudo a respeito do uso de antibióticos na população estudada são alarmantes e despertam uma grande preocupação, principalmente nos controladores de infecção hospitalar, a respeito do uso atual, indiscriminado de antimicrobianos, refletindo uma prática não apenas regional e nacional como também internacional.

A utilização de antibiótico no momento da intervenção foi de 81% nos pacientes no grupo placebo e 72,9% no grupo experimental. O desenvolvimento de bacilos Gram-negativos MDR tem sido associado ao consumo crescente de carbapenêmicos, cefalosporinas de espectro estendido, β -lactâmicos/inibidores de β -lactamases e fluorquinolonas (BANTAR et al., 2004; NEUHAUSER et al., 2003; RICE et al., 1996) e o consumo excessivo de cefalosporinas de espectro estendido tem sido apontado como causa do aumento da prevalência de enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) (BANTAR et al., 2004). Nas últimas décadas o cenário piorou, pois, além do aumento da prevalência de enterobactérias produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), vimos surgir na população de bactérias Gram-negativas, resistência à carbapenêmicos (JESUDASON; KANDATHIL; BALAJI, 2005). A primeira descrição de enterobactérias produtoras de carbapenemases data de 1993 (NAAS; NORDMANN, 1994), desde então, muitas variedades de carbapenemases foram identificadas. As carbapenemases são usualmente capazes de hidrolisar não só carbapenêmicos, mas também os demais beta-lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007), sendo reconhecidas atualmente como um grande problema mundial (CARMELI et al., 2010; CORNAGLIA; GIAMARELLOU; ROSSOLINI, 2011).

A habilidade de colonizar por longos períodos de tempo o trato gastro intestinal humano, tornando os pacientes colonizados verdadeiros reservatórios e amplos disseminadores desses patógenos é outro fator causador do aumento da incidência e prevalência das infecções causadas por bacilos Gram-negativos MDR, não só no ambiente

hospitalar como também na comunidade, em que os pacientes venham a se inserir após sua alta hospitalar (WEINTROB, A., et al, 2010).

Nesse sentido, tentamos desenvolver uma estratégia para permitir a descolonização desses indivíduos. Esta preocupação tem sido objeto de várias pesquisas científicas e poderia produzir um impacto significativo sobre o atual cenário de expansão da resistência bacteriana, notadamente entre os bacilos Gram-negativos (SPELLBERG, B.; BARLETT, J.; GILBERT, D., 2013).

A presente pesquisa foi motivada por inúmeras evidências de estudos anteriores indicando que a existência de fenômenos competitivos entre bactérias consideradas como probióticos e patógenos humanos, resultando inclusive na prevenção de episódios de infecção hospitalar. Em uma meta-análise, Liu et al. (2012) avaliaram 12 estudos onde probióticos foram testados em um grupo experimental, comparado com grupo placebo, para analisar a incidência de pneumonia nosocomial, em pacientes críticos, concluindo que o uso de probióticos reduziu significativamente a incidência de pneumonias nosocomiais na população estudada.

Outros estudos demonstraram que espécies selecionadas de probióticos, tais como *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 e *Lactobacillus fermentum* B- 54 ou RC-14 foram capazes de colonizar e competir com agentes uropatogênicos e diminuir o risco de ITU, quando administrados por via vaginal (REID, BRUCE; TAYLOR, 1995; REID; MILLSAP; BRUCE, 1994). Altos índices de *Lactobacillus* foram identificados como parte integrante da microbiota vaginal de mulheres saudáveis (MCLEAN; ROSENSTEIN, 2000), sendo *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. plantarum* e *L. rhamnosus* as espécies mais comumente observadas (BURTON; REID, 2002). Mulheres com ITU de repetição, por sua vez, apresentam menores índices de cada espécie supracitada na vagina e na uretra (BRUCE et al., 1973).

Várias hipóteses podem ser formuladas para explicar nossos resultados. Possivelmente uma ou duas espécies de probióticos podem ser insuficientes para produzir os resultados desejados. Um efeito análogo ao pretendido pela presente pesquisa foi obtido nos estudos envolvendo uma maior variedade de espécies endógenas com o transplante fecal para a descolonização de pacientes infectados por *C. difficile* (ANDERSON; EDNEY; WHELAN, 2012; GOUGH; SHAIKH; MANGES, 2011; KELLY, 2013; MATTILA et al., 2012). O transplante fecal foi considerado terapia substitutiva ao uso de antibióticos nos casos recorrentes e refratários de infecção por *C. difficile*, uma vez que um recente ensaio clínico randomizado demonstrou que, após o transplante fecal, 81% dos pacientes com infecções

recorrentes por essa bactéria obtiveram remissão dos sintomas após o procedimento, contra apenas 31% dos pacientes do grupo que recebeu vancomicina oral (VAN NOOD et al., 2013). Apesar dos esperançosos resultados, ainda não há concordância a respeito da seleção e screening dos doadores, do volume fecal ideal, a via de administração, o preparo pré-tratamento, a durabilidade da eficácia dos resultados e o perfil de segurança a longo prazo. Além disso, estudos a respeito do mecanismo de ação do transplante fecal para a recuperação da homeostase da microbiota intestinal e a resposta imune do hospedeiro, ainda não existem. Portanto, não podem prover suporte teórico para a aplicação clínica dessa nova opção terapêutica.

Devemos citar como principais limitações do estudo ele ter sido unicêntrico, utilizar o simbiótico por um período relativamente curto de tempo (sete dias) ao invés de durante toda a internação hospitalar (apesar de não possuir referência literária sobre o período ideal de uso). Deve ainda ser mencionada a metodologia empregada para a detecção de colonização gastro-intestinal, já que o padrão-ouro para identificação de bactérias Gram-negativas MDR nesse sítio corporal é a cultura de fezes. Swabs retais, no entanto, são utilizados com maior frequência do que cultura de fezes pelo fato de serem mais facilmente coletados, transportados e analisados. Além disso, são utilizados há décadas em substituição à cultura fecal (MCFARLAND et al., 1987).

A cultura de fezes, para programas de controle de infecção hospitalar e para fins de pesquisa, torna-se impraticável. Além disso, epidemiologistas e pesquisadores frequentemente confiam nos swabs retais ou peri-retais para identificação de organismos MDR (BAUM; FRANZ; GEISS, 2000; CARRATALA et al., 1996; MUTO et al., 2003). Apesar do avanço dessa metodologia, não há na literatura, dados bem estabelecidos a respeito da sensibilidade e especificidade para detecção de bacilos Gram-negativos através de swab retal comparados com o padrão-ouro, a cultura de fezes. Um estudou avaliou e comparou a sensibilidade e especificidade de swab retal e peri-retal com cultura de fezes para identificação de *E.coli* resistente a fluorquinolonas. Foram colhidas 63 amostras, sendo 42 culturas negativas e 21 amostras de fezes nas quais foi identificada a bactéria em estudo, *E. coli* resistente a fluorquinolonas. Destas 21 amostras, 19 (90%) também tiveram a mesma identificação bacteriana nos swabs retais e Peri-retais. Das 42 culturas de fezes negativas, 42 (100%) também tiveram negatividade na metodologia por swab. (LAUTENBACH et al., 2005).

Um último questionamento a ser levantado é se o uso de antibiótico sistêmico, em associação com simbióticos, não possa ter inviabilizado esse alimento funcional e, portanto,

ter dificultado a capacidade de recolonização do trato gastrintestinal. Apesar de termos testado e comprovado a viabilidade dos *Lactobacillus*, não há como garantir que o antimicrobiano utilizado não tenha de alguma maneira interferido na capacidade funcional do simbiótico estudado.

6. CONCLUSÕES

6.0 Conclusões

Em resumo, nas condições estudadas, os dados apresentados nos levam à conclusão de que o uso de *Lactobacillus rhamnosus* associado a *Lactobacillus bulgaricus*, e a FOS, demonstrou-se inefetivo para descolonizar pacientes hospitalizados portadores de bacilos Gram-negativos MDR. Por outro lado, identificamos que o simbiótico estudado se demonstrou seguro, uma vez que seu uso não se relacionou à ocorrência de eventos adversos graves.

Apesar do insucesso da intervenção proposta por esse estudo, estimamos que ele não invalide o potencial da estratégia da descolonização em si, podendo futuros estudos que empreguem maior diversidade de probióticos, por tempo mais prolongado, alcançar essa meta e modificar enfim o curso de expansão universal da resistência bacteriana em bacilos Gram-negativos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ALFALEH, K.; BASSLER, D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. **Cochrane Database Syst Rev** 2008; n.1, CD005496.

AMERICAN THORACIC SOCIETY.; INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, New York, v. 171, n. 4, p. 388-416, 2005.

ANDERSON, J. L.; EDNEY, R. J.; WHELAN, K. Systematic review: faecal microbiota transplantation in the management of inflammatory bowel disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 36, n.6, p. 503-16, 2012.

ASENSIO, A.; OLIVER, A.; GONZALES, P. D.; et al. Outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as a risk factor for colonization and infection. **Clin. Infect. Dis.**, Madrid, v. 30, n. 1, p. 55-60, 2000.

BAERHEIM, A.; LARSEN, E.; DIGRANES, A. Vaginal application of lactobacilli in the prophylaxis of recurrent lower urinary tract infection in women. **Scand. J. Prim. Health Care**, Bergen, v. 12, n. 4, p. 239-43, 1994.

BARRAUD, D.; BOLLAERT, P. E.; GIBOT, S. Impact of the administration of probiotics on mortality in critically ill adult patients: a meta-analysis of randomized controlled trials. **Chest**, Guangxi, v. 143, n. 3, p. 646-55, 2013.

BASAK, S.; SINGH, P.; RAJURKAR, M. Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria. **Indian Journal of Medical Microbiology**, vol 2016.

BANTAR, C.; VESCO, E.; HELF C.; et al. Replacement of broad-spectrum cephalosporins by piperacillin/tazobactam: impact on sustained high rates of bacterial resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Entre Rios, v. 48, n.2, p. 392-5, 2004.

BAUM, H. V.; FRANZ, U.; GEISS, H. K. Prevalence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in hematologic-oncologic patients. **Infection**, Heidelberg, v.28, n. 5, p. 278-81, 2000.

BELLISSIMO-RODRIGUES, W. T.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; VIANA, J. M.; et al. Effectiveness of a dental care intervention in the prevention of lower respiratory tract nosocomial infections among intensive care patients: a randomized clinical trial. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 11, p. 1342-1348, 2014.

BILLER, J. A. ; KATZ, A. J. ; FLORES A.F. ; et al. Treatment of recurrent *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. **J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.**, Dover,v. 21, n. 2, p. 224-6, 1995.

BIN-NUN, A.; BROMIKER, R.; WILSCHANSKI, M.; et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. **J. Pediatr.**, Jerusalem, v. 147, n. 2, p. 192-6, 2005.

BOHM, S.; KRUIS, W. Probiotics in chronic inflammatory bowel disease. **MMW Fortschr. Med.**, Koln, v. 148, n. 35-36, p. 30-4, 2006.

BOUCHER, H. W.; COREY, G. R. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin. Infect. Dis.**, Caracas,v. 46, p. 344-9, 2008. Supplement 5.

BOURNET, F. R. et al. Nutritional aspects of short-chain fructooligosaccharides: Natural occurrence, chemistry, physiology, and health implications. **Dig. Liver Dis.**, Rueil-Malmaison,v. 34, n. 2, p. S111-S120, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de microbiologia clínica para controle de infecção em Serviço de Saúde**. Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de prevenção de infecção relacionada à assistência à saúde**. Brasília, DF, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2616 de 13 de maio de 1998. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 15 maio 1998. Seção I.

BROOKS-BRUNN, J. A. Predictors of postoperative pulmonary complications following abdominal surgery. **Chest**, Indianapolis,v. 111, n. 3, p. 564-71, 1997.

BRUCE, A. W.; REID, G. Intravaginal instillation of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections. **Can. J. Microbiol.**, Toronto,v. 34, n. 3, p. 339-43, 1988.

BRUCE, A. W.; CHADWICK, P.; VANCOTT, G. F. Recurrent urethritis in women. **Can. Med. Assoc. J.**, Ontario,v. 108, n. 8, p. 973-6, 1973.

BRUCE, A. W. ; REID, G. ; MCGROARTY, J.A. ; et al. Preliminary study on the prevention of recurrent urinary tract infections in ten adult women using intravaginal lactobacilli. **Int.Urogynecol. J.**, Ontario,v. 3, n. 3,p. 22-5, 1992.

BURKE, J. P. Infection control - a problem for patient safety. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 348, n. 7, p. 651-6, 2003.

BURTON, J. P.; REID, G. Evaluation of the bacterial vaginal microbiota of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. **J. Infect. Dis.**, Londres, v. 186, n. 12, p. 1770-80, 2002.

BUU-HOI, A.; GOLDSTEIN, F. W.; ACAR, J. F. R-factors in gram-positive and gram-negative aerobic bacteria selected by antimicrobial therapy. **Scand. J. Infect. Dis. Suppl.**, Stockholm, v. 49, p. 46-55, 1986.

CADIEUX, P. A. ; BURTON, J. ; DEVILLARD E. ; et al. Lactobacillus by-products inhibit the growth and virulence of uropathogenic Escherichia coli. **J. Physiol. Pharmacol.**, v. 60, p.13-8, 2009. Supplement 6.

CAMPIERI, M.; GIONCHETTI, P. Probiotics in inflammatory bowel disease: new insight to pathogenesis or a possible therapeutic alternative? **Gastroenterology**, v. 116, n. 5, p. 1246-9, 1999.

CARMELI, Y.; AKOVA, M.; CORNAGLIA, G.; et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. **Clin.Microbiol.Infect.**, Tel Aviv, v. 16, n. 2, p. 102-11, 2010.

CARRATALA, J. ; FERNADEZ-SEVILLA, A. ; TUBAU, F. ; et al. Emergence of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli in fecal microbiota of cancer patients receiving norfloxacin prophylaxis.**Antimicrob.Agents Chemother.**, Barcelona, v. 40, n. 2, p. 503-5, 1996.

CHANG, H. Genetic engineering to enhance microbial interference and related therapeutic applications. **Nat. Biotechnol.**, Rockville, v. 14, n. 4, p. 444-7, 1996.

CHASTRE, J.; FAGON, J. Y. Ventilator-associated pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, Paris, v. 165, n. 7, p. 867-903, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE)**. Atlanta, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE . **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**. v. 32. n. 1. Atlanta, 2012. Disponível em: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/01-CLSI-M02-A11-2012.pdf>. Acesso em 22 de agosto de 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard**. v. 32. n. 3. Atlanta, 2012. Disponível em: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/M100S22E.pdf>. Acesso em 22 de agosto de 2012.

CONWAY, L. J. ; POGORZELSKA, M. ; LARSON, E. L. ; STONE, P. W. Adoption of policies to prevent catheter-associated urinary tract infections in United States intensive care units. **Am. J. Infect. Control**, Nova Iorque, v. 40, n. 8, p. 705-10, 2012.

CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G. M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? **Lancet Infect. Dis.**, Verona, v. 11, n. 5, p. 381-93, 2011.

COELHO, J. M. ; TURTON J. F. ; KAUFMANN, M. E. ; et al. Occurrence of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clones at multiple hospitals in London and Southeast England. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 10, p. 3623-7, 2006.

COELHO, M. C. ; HELUANY-FILHO, M. ; MENEGUETI, M. G. ; et al. **Efficacy evaluation of *Lactobacillus* spp. for decolonizing hospitalised patients carrying multidrug-resistant Gram-negative bacteria**: a randomized pilot study. Poster of the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 23th., Berlin, 2013.

CHOPRA, I.; SCHOFIELD, C.; EVERETT, M.; et al. Treatment of health-care-associated infections caused by Gram-negative bacteria: a consensus statement. **Lancet Infect. Dis.**, Leeds, v. 8, n. 2, p. 133-9, 2008.

CRAVEN, D. E.; STEGER, K. A.; BARBER, T. W. Preventing nosocomial pneumonia: state of the art and perspectives for the 1990s. **Am. J. Med.**, Massachusetts, v. 91, n. 3B, p. 44S-53S, 1991.

DE ARRUDA, I.; DE AGUILAR-NASCIMENTO, J. E. Benefits of early enteral nutrition with glutamine and probiotics in brain injury patients. **Clin. Sci.**, Cuiabá, v. 106, n. 3, p. 287-92, 2004.

DERDE, L. P. ; COOPER, B. S. ; GOOSSENS, H. ; et al. Interventions to reduce colonisation and transmission of antimicrobial-resistant bacteria in intensive care units: an interrupted time series study and cluster randomised trial. **Lancet Infect. Dis.**, Utrecht, v. 14, n. 1, p. 31-9, 2014.

DIAS NETO, J. A.; MARTINS, A. C. P.; TIRABOSCHI, R. B.; et al. Prevalence and bacterial susceptibility of hospital acquired urinary tract infection. **Acta Cir Bras.**, Ribeirão Preto, v. 18, p. 36-38, 2003. Suplemento 5.

DIRETRIZES brasileiras para tratamento das pneumonias adquiridas no hospital e das associadas à ventilação mecânica - 2007. **J. Bras. Pneumol.**, São Paulo, v. 33, p. S1-S30, 2007. Suplemento 1.

ECKBURG, P. B. ; BIK, E. M. ; BERNSTEIN, C. N. ; et al. Diversity of the human intestinal microbial microbiota. **Science**, Stanford, v. 308, n. 5728, p. 1635-8, 2005.

ELMER, G. W.; SURAWICZ, C. M.; MCFARLAND, L. V. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. **JAMA**, Chicago, v. 275, n. 11, p. 870-6, 1996.

EGGIMANN, P.; PITTET, D. Infection control in the ICU. **Chest**, Geneva, v. 120, n. 6, p. 2059-93, 2001.

ESCOSTEGUY, C. C. Tópicos metodológicos e estatísticos em ensaios clínicos controlados randomizados. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v. 72, n. 2, p. 139-43, 1999.

FAKIH, M. G.; DUEWEKE, C. MEISNER, S.; et al. Urinary catheters in the emergency department: very elderly women are at high risk for unnecessary utilization. **Am. J. Infect. Control.**, Grosse Pointe Woods, v.38, n. 9, p. 683-8, 2010.

FALAGAS, M. E.; BLIZIOTIS, I. A. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? **Int. J. Antimicrob. Agents**, Atenas, v. 29, n. 6, p. 630-6, 2007.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clin. Infect. Dis.**, Atenas, v.40, n. 9, p. 1333-41, 2005.

FAGON, J. Y. ; CHASTRE, J. ; DOMART, Y. ; et al. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. **Am. J. Med.**, Paris, v. 94, n. 3, p. 281-8, 1993.

FAVERO, M. S.; CARSON, I. A.; BOND, W. W.; PETERSEN, N. J. *Pseudomonas aeruginosa*: growth in distilled water from hospitals. **Science**, Fênix, v. 173, n. 3999, p. 836-38, 1971.

FEINMAN, S. E. Antibiotics in animal feed - Drug resistance revisited. **ASM News**, v. 64, n. 1, p. 24-30, 1998.

FISHER, L. D.; DIXON, D.O.; HERSON, J.; et al. Intention to treat in clinical trials. In: PEACE, K. E. (Ed.). **Statistical issues in drug research and development**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 331-50.

FONTANA RT. As infecções hospitalares e a evolução histórica das infecções. **Rev Bras Enferm.**, Santo Ângelo, v. 59, n. 5, p. 703-6, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO); WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Expert Consultation Group Health and Nutrition Properties of probiotics in food including powder milk with live lact acid bacteria**. Geneva, 2001.

FOOLAD, N.; BREZINSKI, E. A.; CHASE, E.P.; et al. Effect of nutrient supplementation on atopic dermatitis in children: a systematic review of probiotics, prebiotics, formula, and fatty acids. **JAMA Dermatol.**, Chicago, v. 149, n. 3, p. 350-5, 2013.

FORCHIELLI, M.L.; WALKER, W. A. The effect of protective nutrients on mucosal defense in the immature intestine. **Acta Paediatr. Suppl.**, Bolonha, v. 94, n. 449, p. 74-83, 2005.

GARIBALDI, R. A.; BRITT, M.R.; COLEMAN, M. L.; et al. Risk factors for postoperative pneumonia. **Am. J. Med.**, v. 70, n. 3, p. 677-80, 1981.

GARNACHO-MONTERO, J.; GARCIA-GAMENDIA, J. L.; BARRERO-ALMODOVAR, A.; et al. *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia: epidemiological and clinical findings. **Intensive Care Med.**, Sfax, v. 17, n. 12, p. 1225-1228, 2005.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, Cambridge, v. 125, n. 6, p. 1401-12, 1995.

GOKULA, R. R.; HICKNER, J. A.; SMITH, M. A. Inappropriate use of urinary catheters in elderly patients at a midwestern community teaching hospital. **Am. J. Infect. Control.**, East Lansing, v.32, n. 4, p. 196-9, 2004.

GORBACH, S. L.; CHANG, T. W.; GOLDIN, B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. **Lancet**, London, v. 2, n. 8574, p. 1519, 1987.

GOUGH, E.; SHAIKH, H.; MANGES, A. R. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. **Clin. Infect. Dis.**, Montreal, v.53, n. 10, p. 994-1002, 2011.

GU, W. J.; WANG, F.; TANG, L.; et al. The effects of probiotics in early enteral nutrition on the outcomes of trauma: a meta-analysis of randomized controlled trials. **J. Parenter. Enteral Nutr.**, Guangxi, v. 37, n. 3, p. 310-7, 2013.

GURLEY, B. J. Cranberries as antibiotics? Comment on "Cranberries vs antibiotics to prevent urinary tract infections: a randomized double-blind noninferiority trial in premenopausal women". **Arch. Intern. Med.**, Amsterdam, v. 171, n. 14, p. 1279-80, 2011.

HAMILTON-MILLER, J. M. Living in the 'post-antibiotic era': could the use of probiotics be an effective strategy? **Clin. Microbiol. Infect.**, Londres, v.3, n. 1, p. 2-3, 1997.

HANSEN, D. S.; GOTTSCHAU, A.; KOLMOS, H. J. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. **J. Hosp. Infect.**, Copenhagen, v. 38, n. 2, p. 119-32, 1998.

HAYAKAWA, M.; TORII, K.; SUGIYAMA, S.; et al. Synbiotic therapy reduces the pathological gram-negative rods caused by an increased acetic acid concentration in the gut. **Dig. Dis. Sci.**, Hokkaido, v.57, n. 10, p. 2642-9, 2012.

HEAD, K. A. Natural approaches to prevention and treatment of infections of the lower urinary tract. **Altern. Med. Rev.**, Dover, v. 13, n. 3, p. 227-44, 2008.

HICKSON, M.; SOUZA, A.; MUTHU, NIRMALA.; et al. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. **BMJ**, Londres, v. 335, n. 7610, p. 80, 2007.

HIDRON, A. I. J.; EDWARDS, J. R.; PATEL, J.; et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, Atlanta, v. 29, n. 11, p. 996-1011, 2008.

HILTON, E.; RINDOS, P.; ISENBERG, H. D. Lactobacillus GG vaginal suppositories and vaginitis. **J. Clin. Microbiol.**, Ferrara, v. 33, n. 5, p. 1431-32, 1995.

HOOTON, T. M.; BRADLEY, S. F.; CARDENAS, D. D.; et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. **Clin. Infect. Dis.**, Miami, v. 50, n. 5, p. 625-63, 2010.

HOWELL, L. ed. Global risks 2013, eighth edition: an initiative of the Risk Response Network. **World Economic Forum**, 2013

ISOLAURI, E.; JUNTUNEM, M.; RAUTANEN, T.; et al. A human Lactobacillus strain (Lactobacillus caseisp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. **Pediatrics**, Lima, v. 88, n. 1, p. 90-7, 1991.

JAIN, P.; KANTARJIAN, H.; PATEL, K. P.; et al. Overuse of the indwelling urinary tract catheter in hospitalized medical patients. **Arch. Intern. Med.**, Stony Brook, v. 155, n. 13, p. 1425-9, 1995.

JESUDASON, M. V.; KANDATHIL, A. J.; BALAJI, V. Comparison of two methods to detect carbapenemase&metallo-beta-lactamase production in clinical isolates. **Indian J. Med. Res.**, Vellore, v. 121, n. 6, p. 780-3, 2005.

JOLY- GUILLOU, M. L.; REGNIER, B. **L'infection liée aux soins**: stratégie de maîtrise des infections nosocomiales. Lyon: ÉditionsBioMérieux, 2005.

KELLY, C. P. Fecal microbiota transplantation--an old therapy comes of age. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 368, p. 474-5, 2013.

KOHN, L. T.; CORRIGAN, J. M.; DONALDSON, M. S. **To err is human**: building a safer health system. Washington, DC: National Academy Press, 1999.

KONTIOKARI, T.; LAITINEN J.; JARVI, L.; et al. Dietary factors protecting women from urinary tract infection. **Am. J. Clin. Nutr.**, Oulu, v. 77, n. 3, p. 600-4, 2003.

KNOLL, B. M.; WRIGHT, D.; ELLINGSON, L.; et al. Reduction of inappropriate urinary catheter use at a Veterans Affairs hospital through a multifaceted quality improvement project. **Clin. Infect. Dis.**, Mineapolis, v. 52, n. 11, p. 1283-90, 2011.

LAUTENBACH, E.; HARRIS, A. D.; PERENCEVICH, E. N.; et al. Test characteristics of perirectal and rectal swab compared to stool sample for detection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in the gastrointestinal tract. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Pensilvânia, v. 49, n. 2, p. 798-800, 2005.

LEAPE, L. L.; BRENNAN, T. A.; LAIRD, N.; et al. The nature of adverse events in hospitalized patients. Results of the Harvard Medical Practice Study II. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 324, n. 6, p. 377-84, 1991.

LI, Y.; SHIMIZU, T.; HOSAKA, A.; et al. Effects of bifidobacterium breve supplementation on intestinal microbiota of low birth weight infants. **Pediatr.Int.**, Tóquio, v. 46, n. 5, p. 509-15, 2004.

LIN, H. C.; SU, B. H.; CHEN, A. C.; et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. **Pediatrics**, Taichung, v. 115, n. 1, p. 1-4, 2005.

LINTON, A. H. Antibiotic-resistant bacteria in animal husbandry. **Br. Med. Bull.**, v. 40, n. 1, p. 91-5, 1984.

LIU, K.; ZHU, Y. G.; ZHANG, J.; et al. Probiotics' effects on the incidence of nosocomial pneumonia in critically ill patients: a systematic review and meta-analysis. **Crit. Care**, Xangai, v. 16, n. 3, p. R109, 2012.

LOLANS, K.; RICE, T.W.; MUNOZ-PRICE, S.; et al. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Chicago, v. 50, n. 9, p. 2941-45, 2006.

MAGIORAKOS, A-P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin. Microbiol. Infect.** Off Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2012; 18: 268-281.

MANANGAN, L. P.; PEARSON, M. L.; TOKARS, J. I.; et al. Feasibility of national surveillance of health-care-associated infections in home-care settings. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 8, n. 3, p. 233-6, 2002.

MANIKAL, V. M.; AHMAD, H.; MEHTA, N. J.; et al. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter* species in Brooklyn, New York: citywide prevalence, interinstitutional spread, and relation to antibiotic usage. **Clin. Infect. Dis.**, Nova Iorque, v. 31, n.1, p. 101-6, 2000.

MANZONI, P. ; MOSTERT, M. ; LEONESSA, M.L. ; et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. **Clin. Infect. Dis.**, Turim, v. 42, n. 12, p. 1735-42, 2006.

MARANGONI, D. V.; MARTINS, F. S. V. Infecções urinárias. **Ars.Cvrandi**, v. 19, n. 4, p. 17-25, 1986.

MATTILA, E.; UUSITALO-SEPPALA, R.; WUORELA, M.; et al. Fecal transplantation, through colonoscopy, is effective therapy for recurrent *Clostridium difficile* infection. **Gastroenterology**, Helsinki, v. 142, n. 3, p. 490-6, 2012.

MATTILA-SANDHOLM.T.; MERCENIER, A. The "Food, GI-tract functionality and human health" European Research Cluster, PROEUHEALTH. **Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.**, Lille, v. 11, n. 4, p. 109-13, 2001. Supplement.

MEDDINGS, J. ; ROGERS, M. A. M. ; KREIN, S. L. ; et al. Systematic review and meta-analysis: reminder systems to reduce catheter-associated urinary tract infections and urinary catheter use in hospitalized patients. **Clin. Infect. Dis.**, Michigan, v. 51, n. 5, p. 550-60, 2010.

MCFARLAND, L. V. ; COYLE, M. B. ; KREMER, W. H. ; et al. Rectal swab cultures for *Clostridium difficile* surveillance studies. **J. Clin. Microbiol.**, Seattle, v. 25, n. 11, p. 2241-2, 1987.

MCGROARTY, J. A. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Glasgow, v. 6, n. 4, p. 251-64, 1993.

MCLEAN, N. W.; ROSENSTEIN, I. J. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. **J. Med. Microbiol.**, Londres, v. 49, n. 6, p. 543-52, 2000.

MILLAR, M. R. ; BACON, C. ; SMITH, S. L. ; et al. Enteral feeding of premature infants with *Lactobacillus* GG. *Arch. Dis. Child.*, Winchester, v. 69, n. 5, p. 483-7, 1993. Special Number.

MONNET, D. L. Toward multinational antimicrobial resistance surveillance systems in Europe. **Int. J. Antimicrob. Agents**, Copenhagen, v. 15, n. 2, p. 91-101, 2000.

MONTINI, G.; TULLUS, K.; HEWITT, I. Febrile urinary tract infections in children. **N. Engl. J. Med.**, Bolonha, v. 365, n. 3, p. 239-50, 2011.

MORGAN, M. G.; MCKENZIE, H. Controversies in the laboratory diagnosis of community-acquired urinary tract infection. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.12, n. 7, p. 491-504, 1993.

MORROW, L. E.; KOLLEF, M.H.; NIEDERMAN, M.S.; et al. Probiotic manipulation of the native microbiota in critically ill patients: an opportunity for ventilator-associated pneumonia prophylaxis. **Chest**, Omaha, v. 128, n. 4, p. 128-44, 2005.

MUNOZ-PRICE, L. S.; WEINSTEIN, R. A. Eighteen years of experience with *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care hospital. **Crit. Care Med.**, v. 41, n. 12, p. e480-81, 2013.

MUTO, C. A.; JERNIGAN, J. A.; OSTROWSKY, B. E.; et al. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *enterococcus*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, Pensilvânia, v. 24, n. 5, p. 362-86, 2003.

NAAS, T.; COINGNARD, B.; CARBONNE, A.; et al. VEB-1 Extended-spectrum β -lactamase-producing *Acinetobacterbaumannii*, France. **Emerg. Infect. Dis.** Le Kremlin-Bicêtre, v. 12, n. 8, p. 1214-22, 2006.

NAAS, T.; NORDMANN, P. Analysis of a carbapenemhydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Basileia, v. 91, n. 16, p. 7693-7, 1994.

NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE (NNIS). System Report, Data Summary from January 1990- May 1999. **AJIC Am. J. Infect. Control.**, Atlanta, v. 27, n. 6, p. 520-32, 1999.

NEUHAUSER, M. M.; WEINTEIN, R. A.; RYDMAN, R.; et al. Antibiotic resistance among gram-negative bacilli in US intensive care units: implications for fluoroquinolone use. **JAMA**, Chicago, v. 289, n. 7, p. 885-8, 2003.

OKSANEN, P. J. ; SALMINEN, S. ; SAXELIN, M. ; et al. Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus GG*. **Ann.Med.**, Vantaa, v. 22, n. 1, p. 53-6, 1990.

PALMER, M. B. **Manual de control de infecciones**. Madrid: Interamericana, 1986.

PATERSON, D. L., BENJAMINA., R. How Soon Is Now? **The Urgent Need for Randomized, Controlled Trials Evaluating Treatment of Multidrug-Resistant Bacterial Infection**, 2010.

PETROF, E. O. ; GLOOR, G. B. ; VANNER, S. J. ; et al. Stool substitute transplant therapy for the eradication of *Clostridium difficile* infection: 'RePOOPulating' the gut. **Microbiome**, Kingston, v.1, n. 3, p. 1-12, 2013.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin.Microbiol. Rev.**, Kiel, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

POLLACK, M. ; HUANG, A. I. ; PRESCOTT, R. K. ; et al. Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients.**Lancet**, London, v. 2, n. 7779, p. 668-71, 1972.

PROVONOST, P.; NEEDDHAM, D.; BERENHOLTZ, S.; et al.An intervention to decrease catheter-related bloodstream infections in the ICU.**N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 355, n. 26, p. 2725-32, 2006.

PLUMMER, S.; WEAVER, M. A.; HARRIS, J. C.; et al. *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. **Int. Microbiol.**, Swansea, v.7, n. 1, p. 59-62, 2004.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin. Microbiol. Rev.**, Raritan, v. 20, n. 3, p. 440-58, 2007.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; et al.A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing.**Nature**, Shenzhen, v. 464, p. 59-65, 2010.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides.**Carbohydr.Polym.**, Chengdu, v.77, n. 3, p. 435-41, 2009.

RAUTAVA, S. Potential uses of probiotics in the neonate. **Semin. Fetal Neonatal Med.**, Turku, v.12, n. 1, p. 45-53, 2007.

RAYES, N.; SEEHIFER, D.; THERUVATH, T.; et al. Effect of enteral nutrition and synbiotics on bacterial infection rates after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy: a randomized, double-blind trial. **Ann. Surg.**, Berlin, v.246, n. 1, p. 36-41, 2007.

REID, G.; BRUCE, A. W.; TAYLOR, M. Instillation of Lactobacillus and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. **Microecol. Ther.**, Ontario, v. 23, p. 32-45, 1995.

REID, G.; MILLSAP, K.; BRUCE, A. W. Implantation of Lactobacillus caseivarrrhamnosus into vagina. **Lancet**, London, v. 344, n. 8931, p. 1229, 1994.

REID, G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. **Best.Pract. Res. Clin. Gastroenterol** 2016; 30:17-25

RELLO, J.; OLLENDORF, D. A.; OSTER, G.; et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. **Chest**, Tarragona, v. 122, n. 6, p. 2115-21, 2002.

RICE, L. B. ; ECKSTEIN, E. C. ; SHALAES, D. M. ; et al. Ceftazidime-resistant Klebsiellapneumoniae isolates recovered at the Cleveland Department of Veterans Affairs Medical Center. **Clin. Infect. Dis.**, Cleveland, v. 23, n. 1, p. 118–124, 1996.

ROBERFROID, M. B. Functional foods: concepts and strategy. **J. Pharm. Belg.**, Lovânia, v. 56, n. 2, p. 43-4, 2001.

RODRIGUES, F. B. **Uso de solução oral de clorexidina para prevenção de infecções respiratórias nosocomiais em terapia intensiva**. 2009. Tese (Doutorado em Clínica Médica) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ROY, A.; CHAUDHURI, J.; SARKAR, D.; et al. Role of enteric supplementation of probiotics on late-onset sepsis by candida species in preterm low birth weight neonates: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. **N. Am. J. Med. Sci.**, Bengala Ocidental, v. 6, n. 1, p. 50-7, 2014.

RUMMUKAINEN, M. L. ; JAKOBSSON, A. ; MATSINEN, M. ; et al. Reduction in inappropriate prevention of urinary tract infections in long-term care facilities. **Am. J. Infect. Control.**, Jyväskylä, v. 40, n. 8, p. 711-4, 2012.

SAINT, S.; KAUFMAN, S. R.; ROGERS, M. A.; et al. Preventing hospital-acquired urinary tract infection in the United States: a national study. **Clin. Infect. Dis.**, Michigan, v. 46, n. 2, p. 243-5, 2008.

SANTOS, NQ. A Resistência Bacteriana no Contexto da Infecção Hospitalar. **TextoContextoEnferm.**, Florianópolis, v. 13, p. 64-70, 2004.

SAUNDERS, J. R. Genetics and evolution of antibiotic resistance. **Br. Med. Bull.**, v. 40, n. 1, p. 54-60, 1984.

SAXELIN, M.; PESSI, T.; SALMINEN, S. Fecal recovery following oral administration of Lactobacillus strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. **Int. J. Food Microbiol.**, Helsinki, v. 25, n. 2, p. 199-203, 1995.

SEDDON, J. M. ; BRUCE, A. W. ; CHADWICK, P. ; et al. Introital bacterial microbiota - effect of increased frequency of micturition. **Br. J. Urol.**, v.48, n. 3, p. 211-8, 1976.

SELDEN, R.; LEE, S.; WANG, W. L. L.; et al. Nosocomial klebsiella infections: intestinal colonization as a reservoir. **Ann. Intern. Med.**, Atlanta, v. 74, n. 5, p. 657-64, 1971.

SILVESTRI, L.; VAN SAENE, H. K.; PETROS, A. J. Selective digestive tract decontamination in critically ill patients. *Expert Opin. Pharmacother.*, Gorizia, v. 13, n. 8, p. 1113-29, 2012.

SIITONEN, S.; VAPAATALO, H.; SALMINEN, S.; et al. Effect of Lactobacillus GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. **Ann. Med.**, Tampere, v. 22, n. 1, p. 57-9, 1990.

SOULI, M.; GALANI, I.; GIAMARELLOU, H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. **EuroSurveill.**, Atenas, v. 13, n. 47, p. 19045, 2008.

SPELLBERG, B.; BARLETT, J.; GILBERT, D. N. **The Future of Antibiotics and Resistance NEJM**, 2013.

SUASSUNA, I.; SUASSUNA, I. R. Perspectivas do emprego clínico dos antibióticos. **Tribuna Médica**, v. 14, n. 1, p. 10-7, 1971.

SCHAEFFER, A. J.; STAMEY, T. A. Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. IX. The role of antimicrobial therapy. **J. Urol.**, v.118, n. 1 Pt 2, p. 221-4, 1977.

SPINDLER-VESEL, A. ; BENGMARK, S. ; VOVK, I. ; et al. Synbiotics, prebiotics, glutamine, or peptide in early enteral nutrition: a randomized study in trauma patients. **JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.**, Ljubljana, v. 31, n. 2, p. 119-26, 2007.

SCHABERG, D. R.; CULVER, D. H.; GAYNES, R. P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **Am. J. Med.**, Michigan, v. 91, n. 3B, p. 72S-75S, 1991.

SHALEV, E. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* compared with pasteurized yogurt as prophylaxis for recurrent candidal vaginitis and bacterial vaginosis. **Arch. Fam. Med.**, Afula, v. 5, n. 10, p. 593-6, 1996.

STAMM, A. M. N. F.; COUTINHO, M. S. S. A. Infecção do trato urinário relacionada ao cateter vesical de demora: incidência e fatores de risco. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, Florianópolis, v. 45, n. 1, p. 27-33, 1999.

STAMEY, T. A. The role of introital enterobacteria in recurrent urinary infections. **J. Urol.**, v. 109, n. 3, p. 467-72, 1973.

STAPLETON, A. E. ; AU-YEUNG, M. ; HOOTON, T. M. ; et al. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. **Clin. Infect. Dis.**, Seattle, v. 52, n. 10, p. 1212-7, 2011.

TABLAN, O. C. ; ANDERSON, L. J. ; BESSER, R. ; et al. Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, 2003: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. **MMWR Recomm. Rep.**, Atlanta, v. 53, n. RR-3, p. 1-36, 2004.

TIEN, M. T.; GIRARDIN, S. E. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. **J. Immunol.**, Paris, v. 176, n. 2, p. 1228-37, 2006.

TIPPLE A.F.V. ; PEREIRA, M. S. ; HAYASHIDA, M. ; et al. O ensino do controle de infecção: um ensaio teórico-prático. **Latino-am Enfermagem.**, Goiânia, v. 11, n. 2, p. 245-50, 2003.

VAN NOOD, E.; VRIEZE, A.; NIEUWDROP, M.; et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 368, n. 5, p. 407-15, 2013.

VILLERS, D. ; ESPAZE, E. ; COSTE-BUREL, M. ; et al. Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. **Ann. Intern. Med.**, Nantes, v. 129, p. 182-9, 1998.

WAGNER, R. D.; PIERSON, C.; WARNER, T.; et al. Probiotic effects of feeding heat-killed *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* to *Candida albicans*-colonized immunodeficient mice. **J. Food Prot.**, Madison, v.63, n. 5, p. 638-44, 2000.

WANG, J.; KAI-XIONG, L.; FELINDA, A.; et al. Probiotics for preventing ventilator-associated pneumonia: a systematic review and meta-analysis of high-quality randomized controlled trials. **PLoS One**, Xangai, v. 8, n. 12, p. e83934, 2013.

WANG, Z. K. ; YANG, Y. S. ; STEFKA, A. T.; et al. Review article: fungal microbiota and digestive diseases. **Aliment.Pharmacol.Ther.**, Beijing, v. 39, n. 8, p. 751-66, 2014a.

WANG, Z. K. ; YANG, Y. S. ; CHEN, Y. ; et al. Intestinal microbiota pathogenesis and fecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease. **World J. Gastroenterol.**, Beijing, v. 20, n. 40, p. 14805-20, 2014b.

WARBUTON, D. W.; BOWEN, B.; KONKLE, A. The survival and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* and its effects upon salmonellae in water: methodology to test bottled water in Canada. **Can. J. Microbiol.**, Ottawa, v. 40, n. 12, p. 987-92, 1994.

WENTROB, A. C.; ROEDIGER, M. P.; BARBER, M.; et al. **Natural History of Colonization with Gram Negative Multidrug Resistant Organisms among Hospitalized Patients Source: Infection Control and Hospital Epidemiology**, vol. 31, n. 4 (April 2010).

WITTE W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. **Science**, Wernigerode, v. 279, n. 5353, p. 996-7, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION SCIENTIFIC WORKING GROUP (WHO). Antimicrobial resistance. **Bull. World Health Organ.**, Geneva, v. 61, n. 3, p. 383-94, 1983.

WRIGHT, G. D. Something old, something new: revisiting natural products in antibiotic drug discovery. **Can. J. Microbiol.**, Hamilton, v. 60, n. 3, p. 147-54, 2014.

ZANETTI, G.; PAPARELLA, S.; TRINCHIERI, A.; et al. Infections and urolithiasis: current clinical evidence in prophylaxis and antibiotic therapy. **Arch. Ital. Urol. Androl.**, Milão, v. 80, n. 1, p. 5-12, 2008.

ZELEKE, A.; CHANIE, T.; WOLDIE, M. Medication prescribing errors and associated factors at the pediatric wards of Dessie Referral Hospital, Northeast Ethiopia. **Int. Arch. Med.**, Dessie, v. 7, p. 18, 2014.

ZIMLICHMAN, E.; HENDERSON, D. TAMIR, O.; et al. Health care-associated infections: a meta-analysis of costs and financial impact on the US health care system. **JAMA Intern. Med.**, Chicago, v. 173, n. 22, p. 2039-46, 2013.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

ANEXOS

ANEXO A: Aprovação pelo Comitê de Ética

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 08 de fevereiro de 2012

Ofício nº 461/2012
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"USO DE PROBIÓTICOS PARA PREVENÇÃO DE INFECÇÕES HOSPITALARES EM PACIENTES HOSPITALIZADOS PORTADORES DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS MULTIDROGARRESISTENTES"**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 339ª Reunião Ordinária realizada em 06/02/2012, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 13914/2011.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
MARIANA CORRÊA COELHO
PROF. DR. FERNANDO BELLISSIMO RODRIGUES(Orientador)
Depto. de Medicina Social

ANEXOB: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado paciente ou responsável:

Os avanços da assistência médica hospitalar tornam possível hoje salvar muitas pessoas que anteriormente morriam em decorrência de suas doenças. Entretanto, estes avanços não são isentos de risco, sendo um desses riscos a aquisição pelo paciente de bactérias resistentes a vários tipos de antibióticos e o desenvolvimento de infecção hospitalar. Apesar de todos os esforços preventivos, esta complicação infelizmente continua a ocorrer com relativa frequência nos hospitais brasileiros, assim como em vários outros países do mundo.

Essas bactérias podem simplesmente “habitar” o corpo humano, sem causar doença, como também podem causar infecções de diversos órgãos, como pneumonia, infecção urinária e infecção generalizada, na dependência das reações de defesa que o paciente apresentar contra elas.

Atualmente, os antibióticos disponíveis são capazes de tratar as infecções causadas por estas bactérias, mas não são capazes de eliminá-las completamente do organismo humano. Geralmente, mesmo após o tratamento com antibióticos, elas permanecem vivas no sistema digestivo do corpo (boca, esôfago, intestino) por várias semanas ou meses. Nesta condição, a pessoa portadora pode sofrer novas infecções pela mesma bactéria, ou transmiti-la a outros pacientes e outras pessoas de seu convívio, após a alta hospitalar.

Por este motivo, para minimizar este problema é necessário descobrir um meio eficaz de eliminar estas bactérias do corpo humano e assim diminuir as taxas de infecção hospitalar, sendo esta a justificativa da pesquisa que agora lhe apresentamos.

Um dos exames de cultura colhidos do seu corpo, ou da pessoa por quem você é responsável, acusou o crescimento de uma dessas bactérias de que falamos anteriormente. Gostaríamos então de convidar o(a) senhor(a) à participar, ou autorizar a participação daquele sob sua responsabilidade, em uma pesquisa científica, que tem justamente por objetivo descobrir uma maneira de remover estas bactérias do corpo humano para que ela não desenvolva infecção hospitalar. No caso do senhor(a) estar autorizando a participação de um paciente sob sua responsabilidade temporariamente incapaz de decidir, o mesmo será também consultado quando ele se recuperar e puder decidir por si próprio se deseja ou não continuar a participar da pesquisa.

Nesta pesquisa, uma parte dos pacientes participantes receberá diariamente pela boca, de 12 em 12 horas, durante 7 dias, sachês contendo microrganismos que habitualmente não fazem mal à saúde humana (probióticos), como aqueles encontrados em iogurtes, na expectativa de que eles “expulsem” as bactérias resistentes do sistema digestivo. Outros pacientes receberão sachês contendo apenas farinha e serão considerados o grupo de controle do experimento.

A distribuição dos pacientes num grupo ou no outro se dará por sorteio aleatório e os médicos e enfermeiros que cuidam dos pacientes não saberão qual o tipo de sachê que eles estão usando e tratarão a todos os pacientes da mesma forma, conforme suas necessidades.

Ao longo do estudo, uma vez por semana realizaremos exames de cultura do trato digestivo por meio de um cotonete especial, coletando as amostras do ânus, o que eventualmente poderá causar pequeno desconforto para o paciente. Serão coletadas as amostras de ambos os grupos de pacientes para compararmos se a taxa de eliminação das bactérias resistentes será diferente entre eles ou não. A pesquisa acontecerá durante todo o período de internação do paciente, e não afetará a programação de alta do paciente, isto é, ele não terá de permanecer no hospital além do necessário para a sua recuperação.

Como já dito antes, estes microrganismos probióticos são comercializados livremente no Brasil, na forma de cápsulas ou iogurtes, por serem considerados inofensivos à saúde humana. Mesmo assim, se algum efeito colateral inesperado ocorrer com você ou a pessoa sob sua responsabilidade, o uso da substância será interrompido imediatamente e o problema será avaliado pela equipe médica responsável.

O(A) senhor(a), ou o paciente sob sua responsabilidade, será acompanhado normalmente pela equipe de profissionais de saúde do hospital e pelos médicos infectologistas da comissão de controle de infecção hospitalar, que auxiliarão a condução dos casos, na prevenção e tratamento de quaisquer infecções, para que você ou seu responsável fiquem seguros e bem orientados sobre os procedimentos. A identidade dos pacientes inclusos será preservada em segredo e os resultados da pesquisa serão analisados apenas em conjunto.

Caso você opte por não participar da pesquisa, isso não afetará seu tratamento em nenhum aspecto. Caso opte por ser incluído e depois resolva deixar o estudo durante sua realização, também isto não afetará a continuidade do seu tratamento. Queremos que você se sinta livre para escolher a opção que melhor lhe convém.

A participação na pesquisa não acarretará qualquer despesa financeira ao paciente ou a seus familiares.

Todas as informações adicionais referentes a esta pesquisa que o paciente ou seu responsável familiar deseje obter serão prestadas pelo pesquisador responsável antes, durante ou mesmo após o término de sua participação no estudo.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fernando Bellissimo Rodrigues

Dra. Mariana Corrêa Coelho Salomão

Mário Augusto Heluany Filho

Pesquisadores responsáveis:

Mário Augusto Heluany Filho/ Telefone: (16) 8117-9190

Mariana Corrêa Coelho Salomão/ Telefone: (16) 8193-8103

Assinatura do paciente: _____ Data: __ / __ / ____

Assinatura do responsável: _____ Data: __ / __ / ____

ANEXO C: Metodologia laboratorial de detecção de bacilo Gram-negativo MDR

Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from Rectal Swabs

Purpose

To identify patients colonized with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in the intestinal tract. Patients who grow these organisms should be placed on Contact Precautions (5) to prevent transmission of the resistant bacteria. The procedure described below is a modification of the procedure described by Landman et al. (4). See the procedural notes for steps in the procedure which can be modified.

Background

Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) are usually resistant to all β -lactam agents as well as most other classes of antimicrobial agents. The treatment options for patients infected with CRE are very limited. Healthcare-associated outbreaks of CRE have been reported. Patients colonized with CRE are thought to be a source of transmission in the healthcare setting (1). Identifying patients who are colonized with CRE and placing these patients in isolation precautions may be an important step in preventing transmission (6).

Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae occurs when an isolate acquires a carbapenemase or when an isolate produces an extended-spectrum cephalosporinase, such as an AmpC-type β -lactamase, in combination with porin loss. In the United States, the most common mechanism of carbapenem resistance is the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC).

Detection of carbapenemase production is complicated because some carbapenemase-producing isolates demonstrate elevated but susceptible, carbapenem MICs. CLSI has published guidelines for detection of isolates producing carbapenemases (CLSI document M100) (2). For isolates that test susceptible to a carbapenem but demonstrate reduced susceptibility either by disk diffusion or MIC testing, performing a phenotypic test for carbapenemase activity, the Modified Hodge Test (MHT), is recommended.

Carbapenem resistance and carbapenemase-production in any species of Enterobacteriaceae is an infection control concern. However, the methodology described here focuses on the detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Klebsiella* spp and *E. coli* as this facilitates performance of the test in the microbiology laboratory and, more importantly, because these organisms, especially *Klebsiella* spp, represent the vast majority of CRE encountered in the United States (3).

Reagents

5 ml Trypticase Soy Broth
10- μ g carbapenem disks
MacConkey agar

Equipment

Vortex
35 $\pm$ $^{\circ}$ C, ambient air

Supplies

100 μ l calibrated pipettes
Forceps
Sterile loops

Specimen

Rectal swab or perianal swab specimen in suitable transport media

Special safety precautions

Biosafety Level 2

Quality Control (QC)

The carbapenem disks that are used in this procedure should be quality control tested using disk diffusion methods and quality control strains as described in the CLSI guideline documents M2 and M100 (2,(2)). For example, if the 10- μ g/mL meropenem disk is used in this procedure, test *E. coli* ATCC 25922 by the disk diffusion method using meropenem disks from the same lot. An acceptable control test will yield a zone size between 28-34 mm. Follow CLSI guidelines for frequency of disk QC testing and corrective action if results are out of range.

Procedure

Step 1 Day One	<p>Aseptically, place one 10-μg ertapenem or meropenem disc in 5 ml trypticase soy broth (TSB) (see procedure note 1)</p> <p>Immediately inoculate the broth with the rectal culture swab</p> <p>Incubate overnight at $35 \pm 2^\circ\text{C}$, ambient air</p>
Step 2 Day Two	<p>Vortex and subculture 100 μl of the incubated broth culture onto a MacConkey agar plate (see procedure note 2)</p> <p>Streak for isolation</p> <p>Incubate overnight at $35 \pm 2^\circ\text{C}$, ambient air</p>
Step 3 Day Three	<p>Examine the MacConkey agar for lactose-fermenting (pink-red) colonies. More than one colony morphology may represent different species of Enterobacteriaceae (see procedure note 3).</p> <p>It may be necessary to subculture representative colonies of each morphology type to a non-selective media for isolation and/or for susceptibility testing.</p> <p>Screen representative isolated colonies using a phenotypic test for carbapenemase production, such as the Modified Hodge Test (MHT) or test for carbapenem susceptibility using a standardized method and follow the CLSI guidelines for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (see procedure note 4).</p>
Step 4 Day Four	<p>For CRE and/or MHT-positive isolates, perform species-level identification.</p>

Interpretation/Results

Report all cultures that are positive for CRE or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae to the appropriate infection control personnel. Contact Precautions should be implemented for all patients with positive cultures for CRE or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.

Quality assurance

The ability to recover CRE using this procedure could be assessed as follows: Inoculate 5mL of TSB containing the 10-ug carbapenem disk with a swab that was used to sample a known CRE-negative stool specimen. In addition, inoculate the TSB with 0.5 mL of a 1×10^5 CFU/mL suspension of a known carbapenemase-producing isolate (e.g., *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705), (see procedural note 5 for suspension preparation) Proceed with Step 2 of the procedure. The carbapenemase-producing *K. pneumoniae* should be recovered on the MacConkey agar.

To test for specificity of the procedure, use a carbapenem susceptible *Klebsiella pneumoniae*, (e.g. ATCC 700603) and follow the same steps. The carbapenem susceptible *K. pneumoniae* isolate should not grow on the MacConkey agar.

Method limitations

1. Patients may be colonized with CRE or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a concentration that is not detectable by this method. Studies described by Landman et al. and studies performed at the CDC suggest that the lower limit of detection is between ranges from 1×10^5 CFU/mL to 1×10^6 CFU/mL (4).
2. Non-fermenting gram-negative bacilli with intrinsic mechanisms of carbapenem-resistance, such as *Acinetobacter* spp. and *P. aeruginosa*, will be detected on the MacConkey agar. These isolates should be identified as non-lactose fermenters on the MacConkey agar and therefore would not be picked for characterization. If carbapenem-resistant non-fermenters are present at high concentration, they could overgrow CRE or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae on the media and prevent detection of colonization.
3. Enterobacteriaceae can be resistant to carbapenems by mechanisms other than a carbapenemase, the most common of which is expression of an extended-spectrum cephalosporinase, such as an AmpC-type enzyme or an ESBL, combined with porin loss. These isolates will also grow on the MacConkey agar and be identified as carbapenem-intermediate or resistant by standard susceptibility testing but these isolates are negative by the MHT. For isolates that test intermediate or resistant to carbapenems, it may not be necessary to distinguish between these mechanisms of resistance because all carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae produce a broad-spectrum β -lactamase, and are therefore an infection control concern. Implementing Contact Precautions for patients colonized with these bacteria would be appropriate. Laboratories may choose to test carbapenem-intermediate or resistant isolates with the MHT to identify carbapenemase-production for epidemiological purposes.

Procedure notes

1. The procedure described by Landman et al. (4) describes using a 10- μ g imipenem disk for step 1. However, there are species of Enterobacteriaceae which have intrinsic mechanisms of resistance to imipenem other than a carbapenemase (See CLSI document M100, Appendix G)(2). Therefore, ertapenem or meropenem may provide more specific selection for acquired carbapenem resistance in Enterobacteriaceae.
2. Some laboratories performing cultures for isolation of CRE from rectal specimens place a 10- μ g carbapenem disk in the first quadrant of the MacConkey plate. Only colonies growing "close" to the carbapenem disk are picked for characterization. No clear criteria for "close" have been established. However, it may be helpful to use either a meropenem or ertapenem disk and then apply the CLSI disk diffusion screening criteria to identify potential carbapenemase-producing isolates (i.e., an ertapenem or meropenem disk zone ≤ 21 mm). Note: These zone size criteria

- 4 -

were validated for standardized disk diffusion testing methods as described in CLSI document M2.

3. Carbapenemases are known to exist in several different species of gram-negative bacilli including species of Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. However, carbapenemases are more common in lactose-fermenting species of Enterobacteriaceae (e.g., *K. pneumoniae* and *E. coli*) than in non-lactose fermenting Enterobacteriaceae (e.g. *Serratia marcescens* and some *Enterobacter* spp.) and *P. aeruginosa*. In this procedure, it is suggested that laboratories focus their efforts on detection of resistant lactose-fermenting bacteria to reduce workload. Healthcare facilities that have identified clinical infections with carbapenemase-producing non-lactose fermenting gram-negative species should consider altering this procedure to include characterization of colonies with a morphology that is consistent with those species.
4. The exact procedure for confirmation of CRE or carbapenemase-production should be laboratory-specific and chosen based upon laboratory workflow and the types of isolates causing clinical infections in the patient population served. It may be helpful to refer to the CLSI guidelines for identification of carbapenemase production in isolates that test susceptible to carbapenems in document M100 (2).
5. A 1×10^4 CFU/mL suspension of the known carbapenem-resistant or carbapenem-susceptible isolates could be prepared as follows: Dilute 0.1 mL of a 0.5 McFarland standard suspension (equals approximately 1×10^8 CFU/ mL), in 9.9 mL sterile water or saline for a 1:100 dilution. From the 1:100, dilute 1.0 mL in 9.0 mL water or saline for a 1:1000 dilution. Add 0.5 mL of the 1:1000 dilution (equals approximately 1×10^5 CFU/mL), suspension to the 5 mL TSB for a final concentration of approximately 1×10^4 CFU/mL.

References

1. Calfee, D., and S. G. Jenkins. 2008. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 29:966-8.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. 2009. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Nineteenth informational supplement. M100-S19. CLSI, Wayne, PA.
3. Deshpande, L. M., R. N. Jones, T. R. Fritsche, and H. S. Sader. 2006. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). *Microb. Drug Resist.* 12:223-230.
4. Landman, D., J. K. Salvani, S. Bratu, and J. Quale. 2005. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *J. Clin. Microbiol.* 43:5639-5641.

5. Siegel, J. D., E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello, and HICPAC. 2007. Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings 2007. www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf
6. Siegel, J. D., E. Rhinehart, M. Jackson, L. Chiarello, and HICPAC. 2006. Management of Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings 2006. www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/ar/mdroGuideline2006.pdf

ACHADOS MICROBIOLÓGICOS DURANTE E APÓS A INTERVENÇÃO(swab ≥ n°2):

S wa b	Bac téria	A M I	A M P	S D A	A T M	ES BL	C F L	C P M	C T X	C F O	C A Z	C I P	P O L	E T P	G E N	IP M	M E R	A M I

DESFECHEO MICROBIOLÓGICO OBSERVADO

- Resultado da descolonização:

() Totalmente efetiva

() Parcialmente efetiva

() Totalmente inefetiva

() N°do primeiro swab negativo
- Intervalo entre a admissão no estudo e o 1° swab negativo para bactérias MDR, em dias: ()