

BRUNA DEL GUERRA DE CARVALHO MORAES

Impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* na colonização, na infecção por bactérias multirresistentes e no microbioma de pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre.

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof^a Dra. Sílvia Figueiredo Costa.

São Paulo
2021

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.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Universidade de São Paulo

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Moraes, Bruna Del Guerra de Carvalho
Impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* na
colonização, na infecção por bactérias
multirresistentes e no microbioma de pacientes
submetidos a transplante de células tronco
hematopoiéticas / Bruna Del Guerra de Carvalho
Moraes. -- São Paulo, 2021.
Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.Microbioma gastrointestinal
2.Probióticos 3.Transplante de medula óssea 4.RNA
ribossômico 16S 5.Resistência microbiana a
medicamentos

USP/FM/DBD-146/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Bruna Del Guerra de Carvalho Moraes. Impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* no microbioma de pacientes na colonizados por bactérias multirresistentes e submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas [mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Aprovado em:

Banca examinadora:

Prof. Dr.....

Instituição

Julgamento.....

.....

Profa. Dra.....

Instituição

Julgamento.....

.....

Prof. Dr.....

Instituição

Julgamento.....

.....

*...Aos meus pais, padrasto e madrasta, minhas irmãs e
sobrinhos que sempre fizeram o melhor por mim e
entenderam algumas ausências e períodos de loucuras e
cansaço.*

*...Ao meu esposo, Felipe Moraes, minha maior conquista
e amor. Minha fonte de inspiração a cada dia. Meu eterno
professor!*

Agradecimentos

A profa. Dra. Silvia F. Costa que me enxergou em meio a tantos profissionais e me abriu as portas para um desejo: fazer mestrado e estudar microbioma, sem deixar o transplante de células tronco hematopoiéticas. Com muita paciência ela me permitiu crescer e aprender muito. Sou extremamente grata! Admiro-te!

À banca examinadora da pós-graduação da disciplina de infectologia e doenças parasitárias que me questionou “por que você?”. Eu estava pronta para inúmeras indagações exceto essa. Esse questionamento ecoou por todo esse período e ainda permanece. Algumas vezes tal som teve tom de tristeza, como algo muito complexo e que eu seria incapaz de progredir. Entretanto, na maioria das vezes esse ruído acendeu em mim vontade de reagir ao desafio. Habilidade que talvez eu esteja acostumada, pois nunca escolho o mais simples.

À equipe do LIM49 e LIM46: Midiã que fez a extração de DNA dos primeiros materiais fecais que eu trouxe; Saidy que me ajudou trazendo algumas amostras para o LIM quando eu não podia; Constância que me contou sua história enquanto me ensinava a fazer o PFGE; Elenice sempre preocupada e disposta a ajudar e que me socorreu algumas vezes no LIM; Inneke que sempre demonstrou interesse pelo tema e isso me animou muito; Dra. Jessica que compartilhou com outros profissionais e médicos esse projeto e expos muita confiança nos resultados; Dr. Lauro e Dr. Victor que me auxiliaram com explicações e no desenvolvimento do primeiro poster para um congresso internacional; Dra. Eveline que sempre estava disposta a ajudar e me auxiliou inúmeras vezes com a logística de material biológico.

Ao Gaspar que aprendeu todo o processo do sequenciamento e o fez brilhantemente, com muito cuidado e organização sempre! Camila sempre disposta a ajudar e responsável pelos primeiros PCRs e parte financeira do processo. Sania, sempre um amor, mostrou-me o que é o Cepheid e sua técnica, ajudou-me com a identificação de inúmeros isolados! Joyce que tem colaborado muito nas extrações de DNA das amostras fecais e a organização das amostras para posterior sequenciamento. Dr. Lewis que, em um momento de desespero sobre o que fazer com inúmeros dados me proporcionou algumas ideias de análises estatísticas. Dr. Jose Bampi e Dr. Vitor Oliveira, sem vocês seria impossível ter finalizado as análises de ESBL, PFGE e PCR.

A Marina Farrel, uma pessoa maravilhosa, muito inteligente, focada, sem você não eu teria muitos dados de colonização. Obrigada por me orientar quando eu estava perdida.

A Beatriz, tenho muito que agradecer! Participou das culturas de vigilância, das extrações de DNA das amostras fecais, dos sequenciamentos, das organizações das amostras, ajudou-me com logística de material biológico e tantas outras coisas... sempre disposta e gentil!

A Beatriz dos Anjos, mais uma pessoa maravilhosa que veio para ajudar demais. Seu carinho por mim é algo muito doce e especial. Eu te agradeço demais por todo o cuidado e preocupação em me ajudar nos PFGE e PCRs.

A Ana Marchi, sem palavras para agradecer! Ana, você é uma pessoa extremamente especial. Obrigada por sentar comigo, acalmar-me quando precisei, ensinar-me tudo sobre PFGE e PCR e tantas outras coisas do mundo da microbiologia. Obrigada pelas correções e análise dos meus textos. Muito obrigada de coração! Sua presença e seu cuidado sempre me acalmam!

A Roberta, como poderei agradecer? Você é uma pessoa incrível, repleta de conhecimento e um coração enorme. Obrigada por sanar inúmeras dúvidas, obrigada por me acolher, ouvir minhas angústias, sofrer comigo e para mim nas análises de bioinformática e também nas análises estatísticas do microbioma. Não foi fácil, mas você sempre arrasa. Admiro-te muito! Muito obrigada pelas aventuras no mundo complexo do microbioma intestinal.

Ao Lucas!! Que paciência! (risos) Obrigada porque comigo você sempre teve muita paciência, ensinou-me todo os processos do sequenciamento e por milhões de vezes a questão de custos e compras de insumos para os procedimentos do sequenciamento. Organizou tudo e não deixou que nada saísse do controle, mesmo quando a corda estava no pescoço. Zelou para que os alunos aprendessem a reproduzir os processos, foi atento e muito responsável com os materiais biológicos do meu estudo. Sempre foi um amor comigo! Obrigada por suas risadas, adoro! Obrigada por me acolher tão bem e me ensinar demais.

A Dra. Ester Sabino que contribuiu com a estrutura para as análises de microbioma, mas também em orientações e ideias para que essa tese desse certo.

Sem vocês nada dessa tese seria possível! Muito obrigada!

À equipe do TCTH HCFMUSP que me auxiliou demais em cada processo. Priscila Musqueira, mulher forte, profissional sem igual! Sem você seria impossível ter informações sobre os pacientes e toda a trajetória deles, bem como o auxílio que tive de toda a equipe da enfermagem através das suas orientações. Ju, Juliana Turca, obrigada por todas as inúmeras coletas de swab, colaborar com as orientações aos pacientes, receber amostras para mim e tantos outros auxílios. Liliane Pinheiro, obrigada por agregar e me auxiliar demais dentro da UCTC, fazendo com que desse certo. Elizangela, obrigada por sempre ter o controle das situações e ter mil olhos para tudo e todos, auxiliou-me muito durante o período de internação dos pacientes. Assim como Priscila, Dinaura, Vilma, Marcelo.

A Carolina Ferreira, uma pessoa linda e uma profissional exemplar. Obrigada pela sua sistematização, suas orientações e seu modo de ver a vida. Aprendo e divirto-me muito com você! Anna Bortolluchi e Tamiris Hinsching, sem vocês eu não conseguiria ter controle dos Lactobacillus. Obrigada por se envolverem, se preocuparem e me ajudarem demais.

Aos médicos do TCTH, em especial Dra. Livia Mariano, pessoa com quem tenho tido um contato mais próximo e tenho aproveitado cada momento. Agradeço por me ensinar pela pessoa que é e me abrir portas para expandir meus conhecimentos e minha atuação profissional.

Ao Dr. Giancarlo Fatobene, obrigada pela paciência, por me ensinar pesquisa clínica, por permitir que eu aprenda a cada dia para que possa colaborar em muitas outras pesquisas dentro da hematologia, área que amo muito também.

Ao Prof Dr. Vanderson Rocha. Professor, certa vez como nutricionista falei para o sr. que “eu não estava brincando”, confesso que não estou, estou procurando aprender, crescer e agregar cada dia mais na equipe. Obrigada por me acolher na Hematologia e me proporcionar novas experiências.

À equipe de gerenciamento de dados da hematologia, da qual tenho muito amor e faço parte. Aprendo cada dia mais com vocês. A Mayara por me ensinar a cada dia a paixão pela hemato e a vontade de fazer grandes coisas pelos pacientes; Amanda por me ensinar a calma, o equilíbrio e a dedicação imensa; Lucas por me ensinar que podemos sempre aprender e ser melhores; Giovana por me ensinar a rir de muitas coisas em situações diversas e sempre manter a união e a amizade.

Leonardo merece um capítulo especial. Além de me ensinar a ter foco, dedicação, objetividade, e que não é tão difícil assim estudar estatística (risos), ensina-me a paciência. Aliás sou grata por toda a paciência durante todos esses dias de trabalho em conjunto. Como te disse uma vez, “nos equilibramos”. Enquanto minha cabeça é cheia de cores e artes abstratas soltas, sua cabeça tem formas geométricas bem estabelecidas e organizadas. Agradeço por me ensinar muitas coisas. Agradeço por me apresentar como ler artigos, como escrevê-los, como analisar os dados, como trabalhar com dados, como ser crítica com as análises e tantos outros aprendizados. Muito obrigada, Leo!

À equipe do ICESP que aceitou a manutenção da minha pesquisa dentro do instituto durante os dias difíceis de 2020, principalmente a gerente de enfermagem e coordenadora da pesquisa Adriana Marques.

À equipe do Dr. Emmanuel em especial a Dra. Thais Fernanda Bartelli, uma profissional maravilhosa que me ensinou muitas coisas sobre microbioma em pouco tempo. Aprendi muito com suas correções, suas análises e seus gráficos lindíssimos. Obrigada por me ajudar, por sua humildade e generosidade!

Às nutricionistas da Divisão de Nutrição e Dietética, principalmente a Veruska Scabim. Cada uma a sua maneira me ensinou preciosidades para a vida e me impulsionou a continuar em frente. Guardo cada uma no coração.

À minha querida família que me apoiou sem entender muito bem no que eu estava me metendo. Ao meu esposo, meu grande amor, que sempre me permitiu sonhar e voar alto. Ele sempre me inspira e me faz ter confiança.

A Deus, sem Ele nada seria possível. Ele é meu refúgio, minha fortaleza, meu descanso, Deus em quem eu confio, sei que me guarda, me dá entendimento daquilo que não consigo compreender, Ele me sustenta, Ele me anima, Ele me faz ter capacidade para aprender e enfrentar qualquer coisa. Ele me ajuda em todo o tempo.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Investigação Médica – 49, com colaboração do Laboratório de Investigação Médica – 46 da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na Unidade Clínica de Terapia Celular e no Ambulatório de Transplante de Medula óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Os dados gerados dos sequenciamentos de microbioma foram depositados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*) sob o número de *Bioproject* PRJNA724885.

Moraes BDGC. *Impacto do uso de Lactobacillus plantarum na colonização, na infecção por bactérias multirresistentes e no microbioma de pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021.

Introdução - A colonização intestinal prévia por bactérias multirresistentes (BMR) é um fator de risco para infecções da corrente sanguínea (ICS) e uma das principais complicações na fase inicial do Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas (TCTH). Avaliamos o impacto do *Lactobacillus plantarum* na modulação do microbioma intestinal em candidatos ao TCTH colonizados por BMR. **Métodos** - Amostras de fezes foram obtidas previamente à introdução de *L. plantarum* e ao TCTH, na segunda semana de uso do *L. plantarum*, na neutropenia, na semana anterior a infecção e na enxertia do TCTH. Foram incluídos 42 candidatos a TCTH autólogo ou alogênico com diagnósticos oncohematológicos. Os participantes foram alocados em um grupo de intervenção (n=22) que recebeu cápsulas de *L. plantarum* (5×10^9 UFC) duas vezes ao dia antes do TCTH até o início da neutropenia e um grupo controle (n=20). A região V4 do gene rRNA bacteriano 16S foi sequenciada em 93 amostras de fezes de um subconjunto de 33 pacientes. Colonização por MDRO foi avaliada por cultura em meio seletivo e PCR para identificação de genes de resistências. Clonalidade dos isolados foi avaliada por PFGE. **Resultados** – A média da adesão à intervenção foi de 86% ($\pm 11\%$) por cerca de 43(± 29) dias de consumo. *L. plantarum* foi seguro, tolerável e associado a um aumento na abundância de *Lactobacillales* ($p = 0,004$). Aumento de *Lactococcus* e redução de *Turicibacter* foram identificados na segunda semana de uso de *L. plantarum*. Não houve diferença na redução de BMR entre os grupos, nem um mesmo perfil clonal dos isolados foi identificado entre os pacientes. Foi encontrado maior abundância de *Enterococcus* no grupo controle na enxertia do TCTH. Diversidades alfa e beta foram alteradas ao longo do procedimento de TCTH, independentemente do uso de *L. plantarum*. **Conclusões** - *L. plantarum* foi seguro e pode, potencialmente, reduzir os níveis fecais do gênero *Enterococcus* em candidatos a TCTH. No entanto, não mostrou impacto significativo na descolonização por BMR.

Descritores: Microbioma gastrointestinal; Probióticos; Transplante de medula óssea; RNA ribossômico 16S; Resistência microbiana a medicamentos.

Moraes BDGC. *Impact of exogenous Lactobacillus plantarum on the gut microbiome of hematopoietic stem cell transplantation patients colonized by multi-drug resistant bacteria* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2021.

Background - Previous gut colonization by multidrug resistant organisms(MDROs) is a risk factor for bloodstream infections(BSI) and a major complication in the early phase of Hematopoietic Stem Cell Transplantation(HSCT). We evaluated, in an exploratory study, the impact of *Lactobacillus plantarum* on modulation of the gut microbiome in HSCT patients colonized by MDROs. **Methods** - Stool samples were obtained at timed intervals from 42 oncohematological candidates undergoing autologous or allogeneic HSCT. Participants were allocated to an intervention group(IG = 22) who received capsules of *L. plantarum*(5×10^9 CFU) twice a day before the HSCT until the onset of neutropenia and a control group(CG= 20). The V4 region of the 16S bacterial rRNA gene in 93 stool samples from a subset of 33 patients was sequenced. Colonization by MDRO was evaluated by culture in a selective medium and PCR to identify resistance genes. Clonality of the isolates was assessed by PFGE. **Results** - *L. plantarum* had an average 86%($\pm 11\%$) drug-target engagement at 43(± 29) days of consumption and it was safe, tolerable and associated with an increase in the abundance of the *Lactobacillales*($p=0.004$). Differently abundant bacteria were investigated by LefSe and an increase of *Lactococcus* and reduction of *Turicibacter* were identified on the second-week of *L. plantarum* use. Both the IG and CG exhibited a similar reduction in MDROs; there was not the same clonal profile of the isolates identified among the patients; except *Enterococcus* abundance which had a greater rise in the CG. Alpha and beta diversity measures were altered throughout the HSCT procedure, regardless of *L. plantarum* usage. **Conclusions** – *L. plantarum* was safe and may potentially reduce fecal levels of *Enterococcus* genus in HSCT candidates; however, it has not showed a significant impact on MDRO decolonization.

Descriptors: Gastrointestinal microbiome; Probiotics; Bone marrow transplantation; RNA ribosomal 16S; Drug resistance microbial.

Lista de Figuras

Figura 1. Linha cronológica do período de consumo de <i>L. plantarum</i> e coleta de material biológico para o estudo	37
Figura 2. Fluxograma do estudo piloto	52
Figura 3. Diagrama do fluxo do estudo piloto	54
Figura 4. Dendograma dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> identificados por PFGE.	60
Figura 5. Dendograma dos isolados de <i>Escherichia coli</i> identificados por PFGE.	61
Figura 6. Curvas de rarefação por Unidades taxonômicas operacionais (A) e por Amplicon sequence variants (ASV) (B) das amostras sequenciadas	63
Figura 7. Taxas de erro para cada transição possível nos nucleotídeos sequenciados.	63
Figura 8. Alteração na diversidade alfa por ASV observado, Shannon, Simpson e índice de uniformidade de Pielou entre os pacientes de TCTH entre os períodos por grupos. Os índices de diversidade alfa foram testados para diferenças usando o teste de soma de postos de Wilcoxon (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). A linha contínua representa a mediana e a região sombreada os percentis 25 e 75.	64
Figura 9. Diversidade alfa por Faith PD e Pielou evenness.	65
Figura 10. Medidas de diversidade beta de amostras de fezes dos grupos intervenção(IG) e controle(CG) (ANOSIM $p < 0,05$ foi considerado significativo) no baseline e na enxertia.	66
Figura 11. Abundância relativa dos filos no microbioma em amostras de fezes em diferentes períodos de coleta do transplante de células tronco hematopoiéticas.	67
Figura 12. Presença de <i>Lactobacillus</i> ao longo do estudo entre amostras de fezes de participantes do grupo intervenção.	68
Figura 13. Abundância relativa de <i>Turicibacter</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillaceae</i> , <i>Lactobacillales</i> entre o baseline e a segunda semana de consumo de <i>Lactobacillus plantarum</i> .	69
Figura 14. Os biomarcadores potenciais foram definidos pelo tamanho do efeito da análise discriminante linear (LefSe). (A) Cladograma para representação taxonômica de diferenças significativas entre o baseline e a segunda semana do consumo de <i>L. plantarum</i> . (B) LefSe demonstrando aumento da abundância da família <i>Lactobacillaceae</i> após duas semanas de <i>L. plantarum</i> (C) Histograma da pontuação da análise discriminante linear (LDA) para características diferencialmente abundantes entre o baseline e a segunda semana ($p < 0,05$ e pontuação LDA > 2 foram considerados significativos e são mostrados aqui com notação para sua taxonomia correspondente [g = gênero, f = família, o = ordem]). (D) Mapa de calor (heatmap) da abundância relativa de bactérias da ordem de <i>Lactobacillales</i> de pacientes nos grupos de intervenção e controle (*) entre os períodos avaliados.	69
Figura 15. Biomarcadores potenciais foram definidos pelo tamanho do efeito da análise discriminante linear (LefSe) entre os períodos de baseline e enxertia. (A) LefSe demonstrando diminuição na presença de <i>Roseburia</i> e <i>Coprococcus</i> no período de enxertia em comparação com o baseline. (B) Histograma da análise discriminante linear (LDA) para características diferencialmente abundantes entre o baseline e a enxertia ($p < 0,05$ e a pontuação LDA > 4 foram considerados significativos).	70

Figura 16. Abundância relativa do gênero Enterococcus no microbioma entre os grupos intervenção e controle durante o transplante de células tronco hematopoiéticas. _____ 71

Figura 17. Abundância relativa dos filos bacterianos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes por indivíduo do grupo controle (cada cor de esfera representa um indivíduo), por períodos de acompanhamento e por estado nutricional. _____ 72

Figura 18. Abundância relativa dos filos bacterianos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes por indivíduo do grupo intervenção (cada cor de esfera representa um indivíduo), por períodos de acompanhamento e por estado nutricional. _____ 73

Lista de tabelas

<i>Tabela 1. Critérios interpretativos do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para interpretação dos testes de sensibilidades aos antimicrobianos com os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco mensurados em milímetros por bactéria e antimicrobiano analisado.</i>	<i>39</i>
<i>Tabela 2. Iniciadores utilizados para detecção dos genes de resistência</i>	<i>41</i>
<i>Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos modificados para conter uma região de adaptadores para plataforma Ion PGM Torrent.</i>	<i>46</i>
<i>Tabela 4. Características clínicas, demográficas e do transplante da população estudada</i>	<i>55</i>
<i>Tabela 5. Colonização por bactéria multirresistente a antimicrobianos dos pacientes incluídos no estudo por grupo de alocação, previamente à inclusão e após a retirada do L.plantarum, durante a neutropenia do transplante de células-tronco hematopoiéticas.</i>	<i>56</i>
<i>Tabela 6. Detalhamento das infecções de corrente sanguínea ocorridas nos pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiético.</i>	<i>58</i>
<i>Tabela 7. Classificação do Estado Nutricional dos participantes no estudo do grupo controle e intervenção. HCFMUSP, 2017-2020.</i>	<i>71</i>

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HC FMUSP
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CONSORT	<i>Consolidated Standards of Reporting Trials</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
HCFMUSP	Hospital Das Clínicas Da Faculdade De Medicina Da Universidade De São Paulo
ICHCFMUSP	Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LIM-46	Laboratório de Investigações médicas - 46
LIM-49	Laboratório de Investigações médicas - 49
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana
UCTC	Unidade Clínica de Terapia Celular

16S rRNA	RNA ribossomal 16s
AMC	Amoxicilina / Ácido Clavulânico
AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulânico
ANCOM	Análise de composição de microbiomas
ANOSIM	Análise de Semelhanças
ASGPPP	Avaliação subjetiva global produzida pelo paciente
ASVs	<i>Amplicon sequence variants</i>
ATM	Aztreonam
BGN	Bactérias Gram-negativas
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BMR	Bactéria Multirresistente a antimicrobianos
CAZ	Ceftazidima
CMV	Citomegalovírus
CRO	Ceftriaxona
CTCAE	<i>Commun Terminology Criteria for Adverse Events</i>
CTX	Cefotaxima
DECH	Doença do enxerto contra hospedeiro, do inglês <i>graft versus host disease</i> (GVHD)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleosídeo trifosfato
ERV	<i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina
ESBL	Beta-lactamases de espectro estendido (do inglês, <i>extended-spectrum beta-lactamases</i>)
GC	Grupo controle (ou no inglês CG, <i>control group</i>)
GI	Grupo intervenção (ou no inglês IG, <i>intervention group</i>)
HSCT	<i>Hematopoietic Stem Cell Transplantation</i>
ICS	Infecção de corrente sanguínea (ou BSI, do inglês <i>bloodstream infections</i>)
ICSADBM	Infecção de corrente sanguínea associada ao dano de barreira mucosa
ICS-CVC	Infecção de corrente sanguínea relacionada ao acesso central
IIQ	Intervalo Interquartil
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LEfSe	algoritmo <i>Linear discriminant analysis Effect Size</i>
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry</i>
MDROs	<i>Multidrug resistant organisms</i>
MO	Medula óssea
NGS	Sequenciamento de nova geração
OTU	Unidades taxonômicas operacionais
PCoA	Análise de coordenadas principais
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PFGE	Eletroforese em Gel de Campo Pulsado
PFT	<i>Pulsed Field Type</i>

RNA	Ácido ribonucleico
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal (<i>Ribosomal ribonucleic acid</i>)
SDD	Descolonização digestiva seletiva
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCTH	Transplante de células-tronco hematopoiéticas
TGI	Trato gastrintestinal
UFC	Unidade formadora de colônias (OU no inglês CFU, <i>colony forming unit</i>)
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>

1.0 Introdução	21
1.1 Transplante de Células Tronco Hematopoiética	22
1.2 Infecção relacionada a assistência à saúde em unidades de TCTH.....	23
1.3 Resistência microbiana	24
1.4 Microbioma Intestinal.....	25
1.5 Microbioma Intestinal e TCTH	27
1.6 Estratégias de descolonização	28
1.7 Probióticos e TCTH.....	29
2.0 Objetivos	31
3.0 Metodologia	33
3.1 Pacientes	34
3.2 Uso de Antibióticos	35
3.3 Avaliação Nutricional	35
3.4 Terapêutica	36
3.5 Avaliação Laboratorial	37
3.5.1 Definição de bactérias multirresistentes	38
3.5.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	38
3.5.3 Identificação dos isolados	39
3.5.4 Detecção dos principais genes de resistência a antimicrobianos	39
3.5.5 Análise de clonalidade pela técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado	42
3.5.6 Microbioma	43
3.5.6.1 Extração de DNA das amostras fecais	43
3.5.6.2 Quantificação do DNA.....	45
3.5.6.3 Amplificação das regiões-alvo	45
3.5.6.4 Purificação dos produtos de PCR	47
3.5.6.5 Preparo do pool equimolar dos produtos amplificados.....	48
3.5.6.6 PCR em emulsão, enriquecimento e carregamento do chip.....	48
3.5.6.7 Reação de sequenciamento	49
3.5.6.8 Processamento de dados, anotação e análise estatística	49
3.6 Desfechos	50

3.7	Análise Estatística.....	51
3.8	Fluxogramas do estudo.....	52
	Fluxograma estudo piloto.....	52
4.0	Resultados.....	53
4.1.	Caracterização da população	54
4.2.	Colonização por BMR	56
4.3.	Infecções	58
4.4.	Clonalidade.....	59
4.5.	Análise da quantidade de L. plantarum nas cápsulas.....	62
4.6.	Adesão ao uso de L. plantarum	62
4.7.	Microbioma	62
4.8.	Características Nutricionais.....	71
	Discussão	74
	Conclusão.....	79
	Referências.....	81
	Publicações	90
	ANEXOS.....	95
8.1	Anexo A.....	96
8.2	Anexo B	99
8.3	Anexo C.....	106
8.4	Anexo D.....	112
8.5	Avaliação Subjetiva Global Produzida Pelo Paciente	112
8.6	Anexo E	113
8.7	Anexo F	114

1.0 Introdução

1.1 Transplante de Células Tronco Hematopoiética

O Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH) é uma modalidade terapêutica para diversas doenças como câncer, anemia aplástica, doenças hematológicas congênitas e doenças auto-imunes (1). Consiste na infusão de células tronco hematopoiéticas com objetivo de restabelecer a função medular (2). As células-tronco são obtidas por meio de punções e aspirações da medula óssea (MO), ou de sangue periférico ou sangue de cordão umbilical (3).

Há dois tipos de TCTH que se diferenciam pelo doador, caso seja do próprio receptor denomina-se autólogo e, se as células progenitoras provêm de um doador, alogênico. A terapia de condicionamento anterior ao TCTH que induz a aplasia medular para infusão das células tronco e posterior enxertia medular com restabelecimento da função do tecido hematopoiético, difere de acordo com o tipo de transplante, a doença de base e as comorbidades do paciente. No transplante alogênico, além destas considerações, é fundamental a terapia imunossupressora iniciada no condicionamento e sua manutenção pós-infusão e enxertia visando à prevenção de rejeição e doença do enxerto contra hospedeiro (DECH ou *graft versus host disease*, GVHD) (3).

O comprometimento do sistema hematopoiético e imunológico aumenta o risco de complicações infecciosas que variam de acordo com o enxerto (proveniente de medula ou células periféricas), o tipo de TCTH e o tempo até a enxertia (4–7). As complicações infecciosas são distintas e podem ocorrer nas diferentes fases do transplante. Na pré-enxertia ou fase I, (< 15 a 45 dias pós-transplante) há risco para infecções bacterianas por bacilo Gram-negativos (BGN), devido ao período de prolongada neutropenia e quebra da barreira mucocutânea, risco de infecções bacterianas por Gram-positivas, pelo uso de dispositivos invasivos como cateter venoso central, risco de infecção por espécies gastrintestinais como *Streptococci*, pelo uso de antibióticos, bem como da reativação do vírus Herpes simples e de infecções fúngicas. Na fase pós-enxertia ou fase II (30 a 100 dias após TCTH), predominam complicações relacionadas a agentes não bacterianos, como citomegalovírus (CMV), herpes vírus, *Pneumocystis jiroveci* e *Aspergillus spp.*, fase marcada pelo prejuízo na imunidade celular. A fase III (> 100 dias após TCTH) é marcada por

complicações crônicas como DECH crônico que aumenta o risco de infecções por *Nocardia spp.*, bem como de infecções causadas por bactérias encapsuladas por prejuízo na opsonização, como *Streptococcus pneumoniae*, além de infecções virais por CMV e o vírus Varicella Zoster. Neutropenia prolongada e DECH são os principais fatores de risco associados com infecção (5). Nas fases II e III o risco destas infecções é proporcional à gravidade do DECH (4,8).

1.2 Infecção relacionada a assistência à saúde em unidades de TCTH

A prevenção e o tratamento de infecções têm melhorado os resultados do TCTH nas últimas décadas, mas ainda representam uma das principais causas de morbimortalidade no TCTH (8,9). Conhecer e definir fatores como a epidemiologia local, a melhor estratégia de profilaxia de infecções e a resistência bacteriana aos antibióticos disponíveis é fundamental para a condução dos casos.

No Brasil, Oliveira et al. realizaram estudo em 13 centros de TCTH brasileiros, com 411 pacientes avaliados no período de neutropenia. Os autores observaram 118 agentes isolados em 91 infecção de corrente sanguínea (ICS), geralmente por um único agente (69 episódios). As bactérias Gram-positivas foram responsáveis por 47% das ICS, sendo o *Staphylococcus coagulase negativo* o principal agente, seguido pelo *Staphylococcus aureus*. Entre os BGN (37%, 59 eventos) o principal isolado foi a *P. aeruginosa*, seguida pela *Klebsiella pneumoniae* e pela *Escherichia coli*. Das BGN isoladas, 37% (22 eventos) eram multirresistentes aos antibióticos (5% do total de casos analisados e 22% dos episódios de ICS) e foram associadas ao uso prévio de cefalosporinas de terceira geração e estar em um centro específico, ou seja, a epidemiologia local. O autor ainda discute a alta frequência de ICS por BGN no país, se comparado a séries Europeias e Norte Americanas (10).

Em consonância, em um estudo conduzido no HCFMUSP, Mendes et al. avaliariam retrospectivamente 429 TCTH durante a neutropenia. Os autores identificaram elevada quantidade de casos de ICS por bactérias BGN (52,3%), sendo a *Pseudomonas aeruginosa* o principal agente etiológico isolado, com 19

casos (22%), seguido por *Staphylococcus* coagulase negativa e *Enterococcus faecium* (ambos com 19,7%) (11).

Infecções por BGN têm altas taxas de complicações e mortalidade pela elevada resposta inflamatória desencadeada por endotoxemia. Frequentemente são utilizadas como profilaxias as quinolonas e os β -lactâmicos, mas a crescente resistência a esses antibióticos tem interferido nos protocolos de tratamento de infecção ativa, como a neutropenia febril, forçando o uso precoce de terapias de amplo espectro (12). Somando-se a isso, Ferreira et al. mostraram que das ICS ocorridas no TCTH do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), 100% dos isolados eram resistentes a quinolona (48). Atualmente, há uma escassez de novos agentes antimicrobianos para tratar os BGN cada vez mais resistentes.

O uso de regimes antibióticos inapropriados e, conseqüentemente, a demora no início do tratamento adequado, é a principal causa de desfechos desfavoráveis em infecções graves, especialmente no pós TCTH imediato (fase I). A identificação dos fatores de risco como a colonização prévia por bactérias multirresistentes (BMR), exposição a antibióticos de amplo espectro, doença subjacente avançada com apresentação clínica grave, prolongada hospitalização e localização do cateter venoso central, são variáveis importantes para guiar estratégias, a fim de reduzir o insucesso terapêutico (13).

Diversas estratégias têm sido aplicadas na descolonização de pacientes oncohematológicos, incluindo os submetidos ao TCTH, com o intuito de reduzir o risco de infecções.

1.3 Resistência microbiana

Micro-organismos tem a capacidade de promover a troca de genes de resistência por diversos mecanismos incluindo principalmente a bomba de efluxo em BGN e os elementos genéticos móveis como os plasmídeos. O mecanismo de efluxo é expresso em todas as células com a função de protegê-las de componentes tóxicos. O aumento da expressão desse mecanismo tem sido associado a bactérias multirresistentes (14).

Um problema emergencial em todo o mundo é a resistência de *Enterobacteriaceae*, em particular *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, aos

carbapenêmicos. Principalmente por β -lactamase da classe-A de Ambler denominada *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e β -lactamase de espectro estendido (ESBL, do inglês *extended-spectrum beta-lactamases*). Os genes *bla*_{KPC} que codificam a enzima KPC estão presentes em plasmídeos transferíveis. A enzima KPC confere resistência a todos os agentes β -lactâmicos incluindo cefalosporinas, monobactams e carbapenêmicos por sua capacidade de hidrolisá-los. A fim de controlar a propagação de *bla*_{KPC} em pacientes hospitalizados, Shanmugam et al. sugerem a avaliação de genes de resistência como medida de controle de infecção para o uso racional de antibióticos (15).

Estudos mostram que pacientes colonizados por bactérias resistentes a antibióticos tem taxas mais elevadas de ICS e maior risco de morte atribuídas a causas infecciosas (16). Adicionalmente, pacientes submetidos à TCTH desenvolvem mais infecções por BMR quando comparado a outras populações (12). Bilinski e colaboradores (2016) demonstraram que a colonização intestinal por BMR reduz a sobrevida global dos pacientes submetidos ao TCTH alogênico por aumento da mortalidade e da incidência de infecções sistêmicas e por DECH agudo (16).

Uma proposta para reduzir infecções por patógenos multirresistentes como *Enterococcus* resistente à vancomicina (ERV), que tem sua densidade de colonização diretamente relacionada com o risco de ICS, é a manipulação da microbiota e a colonização do trato gastrointestinal (TGI) (17,18). No TCTH alogênico, Taur et al. concluíram que a diversidade e a estabilidade da microbiota intestinal são fortemente alteradas, aumentando o risco de infecções (19).

Diversos fatores contribuem para a disbiose no paciente submetido ao TCTH, como o comprometimento da homeostase intestinal pela quebra da função de barreira, a alteração do consumo alimentar e principalmente o uso de antibióticos (20–22).

1.4 Microbioma Intestinal

O microbioma intestinal é um ecossistema dinâmico altamente complexo que compreende aproximadamente 100 trilhões de células microbianas e tem um significativo efeito sobre muitos aspectos da fisiologia humana, incluindo o metabolismo, a absorção de nutrientes e a função imunológica bem como a

proteção contra patógenos. É influenciado por fatores intrínsecos do hospedeiro (genótipo, idade, condições de saúde e nutrição), por interações com outros micro-organismos e pela disponibilidade de nutrientes da dieta (23). O microbioma intestinal representa uma complexa e abrangente comunidade constituída por três grupos predominantes: *Archaea*, *Bacteriae* e *Eucaryae* e é dominada pelos filos *Bacteroidetes* (Gram-negativas) e *Firmicutes* (Gram-positivas) (23).

Devido a sua importância e ampla relação com o hospedeiro humano, o microbioma intestinal tem sido alvo de diversos estudos moleculares ou baseados em cultura, principalmente por meio de amostras fecais, que se comparadas com amostras obtidas por biópsias, não necessitam da realização de um processo invasivo para sua obtenção. Além de abranger materiais, tais como células epiteliais esfoliadas e micro-organismos do meio que podem conter informações relevantes a respeito da microbiota do TGI(24).

O advento da biologia molecular permitiu a redução das limitações encontradas na utilização de métodos de cultivo, além de revelar novas perspectivas sobre a diversidade de micro-organismos existentes na flora intestinal humana (25). Ademais, a inclusão de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) trouxe ainda mais avanços às análises de biodiversidade microbiológica, possibilitando a captação de dados de centenas até milhões de micro-organismos, tornando desta forma os estudos mais abrangentes e confiáveis (26).

O alvo molecular para a análise das comunidades bacterianas, tem sido a sub-unidade menor do RNA ribossomal, 16S rRNA, que possui regiões de seqüências de bases de nucleotídeos altamente conservadas no domínio bacteriano, intercaladas por regiões variáveis, a altamente variáveis, nomeadas de regiões V1 a V9. A utilização do NGS no sequenciamento do gene 16S rRNA, tem sido crucial para facilitar novas descobertas acerca da biodiversidade da microbiota intestinal (27). O sequenciador *Ion Torrent* PGM representa uma das mais novas plataformas de sequenciamento recentemente comercializadas, possuindo menor custo e retorno mais rápido, em comparação com outras plataformas de sequenciamento de nova geração, tais como 454 e Illumina (28). A aplicação da plataforma *Ion Torrent* nos estudos baseados em 16S rRNA tem sido amplamente descrita em diversos estudos, como na na caracterização da

microbiota subgengival (29) e efeitos do cigarro na microbiota oral (30), na avaliação de métodos de tratamento de água (31), além da investigação da composição bacteriana no muco intestinal (32).

1.5 *Microbioma Intestinal e TCTH*

Dados sobre o microbioma de pacientes em TCTH autólogo são escassos. Estudo demonstrou que o microbioma de pacientes submetidos a TCTH alogênico apresentam aumento de *Enterococcus*, *Streptococcus* e várias Proteobacterias. Somando a dominação intestinal por tais bactérias e a redução da diversidade do microbioma no TCTH outro estudo mostrou resultado desfavorável ao desenvolvimento de DECH e morte(33). A maior proporção do *Enterococcus* em fezes de TCTH parece ter relação com o desenvolvimento de DECH de TGI, devido à mudança da microbiota pós TCTH (19). Nessa mesma linha, há evidências de que a colonização intestinal por BMR reduz a sobrevivência global em TCTH alogênico aumentando a mortalidade não relacionada e a incidência de infecção sistêmica e ao DECH agudo (16,22).

Estudo recente realizado no HCFMUSP apontou que a colonização intestinal por bactérias resistentes aos antimicrobianos nos pacientes de TCTH foi um fator de risco independente para ICS (34).

A alteração do microbioma intestinal, independente do TCTH, tem sido implicada em muitas doenças tais como obesidade, doença inflamatória e cancer colorretal. O conhecimento das alterações no microbioma objetivam estabelecer interações hospedeiro-microbiota que possam influenciar o estado saúde versus doença e o avanço em determinar estratégias terapêuticas para melhorar os resultados clínicos. Enquanto essas estratégias frequentemente envolvem o uso de antibióticos, seu uso custa a erradicação de organismos comensais potencialmente salutares e aumentam as taxas de resistência aos antibióticos. Outra alternativa plausível, de menor custo e potencialmente benéfica é a modulação do microbioma com probióticos (21,35,36).

1.6 Estratégias de descolonização

Uma alternativa usada para o tratamento de BGN em algumas unidades de hematologia e de terapia intensiva é a descolonização digestiva seletiva (SDD) pela administração de antibióticos não absorvíveis (colistina e tobramicina) e antifúngicos (anfotericina B) em orofaringe e TGI em combinação com a administração de cefalosporina de terceira geração durante os primeiros quatro dias na unidade hospitalar (37–39). A ideia é que a utilização de antibióticos não absorvíveis seria seletiva para preservar a flora microbiana anaeróbica no trato digestivo, ao mesmo tempo, impedindo a colonização e crescimento secundário de micro-organismos aeróbios e infecções subsequentes (40).

Esta estratégia pode levar à redução de mortalidade e ICS em unidades de terapia intensiva (41,42). Metanálise de 64 estudos clínicos não demonstrou associação significativa entre o uso de SDD e a resistência a antibióticos (43). Em contrapartida, Buelow et al. demonstraram que a quantidade de genes que conferem resistência aos antibióticos mais que dobrou durante o uso de SDD, principalmente de genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, sendo que dois deles são carregados por bactérias comensais anaeróbicas que podem transferi-los a outros gêneros e espécies de bactérias (39). Devido aos resultados controversos da literatura, a SDD não é amplamente utilizada nem recomendada (40).

No TCTH, estudos que datam de 1978 até 2014 mostraram que a descolonização intestinal com antimicrobianos orais sistêmicos e não absorvíveis e impacto positivo na redução do risco às infecções (44–46). Entretanto, estudos subsequentes demonstraram que a menor diversidade microbiana na enxertia estava relacionada a menor sobrevida global e maior taxa de mortalidade especialmente relacionada ao DECH e a infecção (46,47). Outros estudos avaliaram o uso, ou não, de profilaxia antimicrobiana antes do TCTH e o resultado mais uma vez foi desfavorável ao uso de antimicrobianos pela maior incidência e gravidade de DECH agudo e DECH de TGI (48,49).

A análise entre pacientes que desenvolveram DECH agudo e aqueles que não o desenvolveram, revelou que os que desenvolveram a complicação apresentavam menor diversidade no microbioma intestinal anterior ao TCTH,

menor concentração dos gêneros *Bacteroides spp.* e *Parabacteroides spp.* e menor concentração de ácidos graxos de cadeia curta. No período avaliado, os autores concluíram que a DECH está associado a uma maior exposição cumulativa de antibióticos especialmente a clindamicina e que há uma redução na quantidade de *Ruminococcus spp.* e *Blautia spp.* no microbioma, estando esta última relacionada a maior mortalidade vinculada a DECH (50–53). Associado aos prejuízos ao microbioma, Kaysen et al. (53) observaram aumento do número de genes de resistência a antimicrobianos em pacientes durante o período de TCTH alogênico, indicando a pressão seletiva causada pelo uso destas medicações.

Outras estratégias de descolonização podem ser realizadas por meio da modulação do microbioma com a hipótese de que o aumento da diversidade microbiana no TGI pode reduzir a prevalência de colonização por microorganismos resistentes aos antimicrobianos e assim ser uma possível estratégia de controle à infecção.

1.7 Probióticos e TCTH

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) probióticos são organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, podem ser benéficos ao hospedeiro (54). *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as cepas mais estudadas e comercialmente usadas pela segurança, facilidade de cultura e produção (21,36). O gênero *Lactobacillus* é amplamente distribuído no meio ambiente sendo o mais numeroso composto por 145 espécies. Esse gênero é encontrado em fezes humanas e coloniza principalmente o intestino delgado. É um gênero estritamente fermentativo, acumulando ácido láctico no meio, o que provoca redução do pH intestinal e dificulta o crescimento de bactérias comensais ou patogênicas (35).

Modelos animais tem evidenciado que a administração de *Lactobacillus* tem sido associada a menor translocação bacteriana e inflamação intestinal (55,56). A administração de *Lactobacillus* antes e após o TCTH, em experimentos animais, reduziu o DECH agudo a translocação bacteriana e aumentou a sobrevivência (57).

A cepa *Lactobacillus plantarum* tem sido estudada por sua eficácia na codificação de adesina e aderência à parede intestinal competindo por receptores de manose com BGN como *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp*, prevenindo colonização e infecção por estes patógenos (58). *L. plantarum* pode sobreviver à passagem do estômago ao reto e aderir a mucosa intestinal mesmo em pacientes críticos em uso de antibióticos (59). Esse probiótico parece ser promissor na redução de colonização e infecção bacteriana em pacientes submetidos a transplante de fígado e pacientes com pancreatite grave que desenvolveram síndrome de insuficiência respiratória e falência de múltiplos órgãos (58).

No TCTH, *L. plantarum* demonstrou-se ser seguro e de uso factível em crianças e adolescentes mesmo durante o período de neutropenia pré-enxertia, período que apresenta maior risco de translocação bacteriana e subsequente ICS (60). Esse estudo, coordenado por Ladas e colaboradores (60), foi multicêntrico contando com 30 pacientes que utilizaram a cepa desde o D-8 até D+14 do TCTH alogênico com diversos esquemas de condicionamento mieloablativo sem documentar ICS ocasionadas por *Lactobacillus* até D+30.

A partir dessas informações, este projeto se propõe a avaliar o uso de *L. plantarum* na modulação do microbioma intestinal, assim como na descolonização de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes antes do transplante.

Trata-se de um estudo de vanguarda pela análise do microbioma em pacientes brasileiros submetidos ao TCTH, bem como pelo uso de *Lactobacillus* para a descolonização de pacientes.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* na modulação do microbioma intestinal de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes e submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.

2.2 Objetivos Secundários:

Avaliar o microbioma de pacientes transplantados de células tronco hematopoiéticas.

Avaliar a clonalidade e os mecanismos de resistências das bactérias identificadas causando colonização e infecção nos pacientes incluídos no estudo.

Avaliar o uso do *Lactobacillus plantarum* na descolonização de pacientes colonizados por bactérias multirresistentes antes da realização do transplante de células tronco hematopoiéticas.

Avaliar a segurança e os efeitos adversos do consumo de *Lactobacillus plantarum* por pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiéticas.

3.0 Metodología

3.1 Pacientes

Local do estudo: o estudo foi realizado no HCFMUSP (Instituto Central, Prédio dos Ambulatórios e Instituto do Câncer do Estado de São Paulo), na clínica de hematologia, Unidade Clínica de Terapia Celular (UCTC) que realiza cerca de 200 transplantes ao ano entre autólogo e alogênico (aparentado, não aparentado e haploidêntico).

Aspectos éticos: O estudo foi realizado após aprovação do projeto pela Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa do HCFMUSP (CAPPesq - Parecer 2.126.478) (Anexo A) e a obtenção do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) dos pacientes (Anexo B). Todos os pacientes dentro dos critérios de inclusão foram orientados, juntamente com seus cuidadores, quanto à voluntariedade e anonimato da participação no estudo, mesmo quando da publicação dos dados e sigilo de todas as informações.

Aspectos financeiros: Apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº18/13147-3.

Desenho do estudo: tratou-se de um estudo clínico prospectivo que incluiu pacientes previamente ao TCTH de novembro de 2017 a março de 2020. Os pacientes foram divididos em grupos sendo o grupo intervenção (GI) que recebeu o *Lactobacillus plantarum* e o grupo controle (GC) que não o recebeu. Não foi utilizado placebo.

Cálculo de amostra: Não foi realizado o cálculo de amostra. A seleção de pacientes foi por conveniência (amostra não probabilística) em ambos os grupos.

Os *critérios de inclusão* dos pacientes foram: a presença de doença oncohematológica e indicação de TCTH; ter idade acima de 18 anos; não ter realizado cirurgia prévia do TGI; estar colonizador por BMR identificado por cultura de vigilância positiva em no máximo seis últimos meses até adentrar ao estudo; e concordar em participar do estudo após a assinatura do TCLE.

Os *critérios de exclusão* foram: paciente que tenha acordado em participar do estudo, contudo, tenha coletado material fecal após o início da terapia de condicionamento do TCTH; paciente com baixa adesão da terapêutica (<50%).

Todos os pacientes do estudo receberam orientação da farmacêutica e da pesquisadora do estudo com relação ao consumo do *L. plantarum* e às coletas de material biológico.

Infecções foram definidas com o critério da *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) incluindo as infecções de corrente sanguínea associada ao dano de barreira mucosa (ICSADBM)(61) (ANEXO C).

3.2 Uso de Antibióticos

Na admissão do paciente no estudo, foi verificado o uso prévio de antimicrobianos nos últimos dois meses.

A necessidade de antibioticoterapia durante o período do TCTH não excluiu o paciente do estudo. A indicação e a condução da terapia foram conforme avaliação médica. O uso de antimicrobianos na data da coleta de material biológico e durante o TCTH foi verificado para análise junto a diversidade beta do microbioma intestinal.

3.3 Avaliação Nutricional

Todos os pacientes foram avaliados e acompanhados durante o período do estudo.

Foram avaliados peso, altura, índice de Quetelet (índice de massa corporal), classificação do estado nutricional pela OMS ou OPAS na admissão do paciente e aplicado a avaliação subjetiva global produzida pelo paciente (ASGPPP) (ANEXO D).

As toxicidades gastrintestinais ocorridas durante o TCTH foram graduadas de acordo com o *Commun Terminology Criteria for Adverse Events* (CTCAE) (62). A avaliação das fezes foi feita utilizando-se a escala fecal de Bristol (Anexo E) (63,64) previamente ao consumo de *L. plantarum* e após o uso do probiótico.

3.4 Terapêutica

Foi utilizado o probiótico de Filo *Firmicutes*, Classe *Bacilli*, Ordem *Lactobacillus* Família *Lactobacillaceae*, Gênero *Lactobacillus*, Espécie *plantarum*, cepa G18.

O probiótico foi ofertado após primeira coleta de fezes (denominada de *baseline*) para análise de microbioma, mantendo-se por cerca de 30 dias ou mais antes do TCTH, durante o TCTH até a neutropenia, conforme apresentado no esquema abaixo (Figura 1). O consumo de *L. plantarum* foi previamente ao TCTH, variando em dias para cada paciente, e foi cessado na neutropenia do TCTH avaliada por exame de hemograma.

A quantidade ofertada foi de 5×10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) duas vezes ao dia em forma de cápsulas de liberação gástrica produzidas em farmácia de manipulação.

Todos os pacientes foram orientados quanto o uso. A dispensação do produto foi realizada pela farmácia da unidade com posterior análise da quantidade consumida para apreciação de aderência a terapia proposta.

A viabilidade do uso do probiótico foi definida por consumo de 50% da dose orientada por 75% dos pacientes do estudo.

A segurança do uso do probiótico foi pelo desenvolvimento de ICS ocasionada por *L. plantarum* desde o início do uso até D+60. Sintomatologias ocasionadas pelo probiótico foram acompanhadas.

Para análise da composição das cápsulas, foram realizados NGS e cultura do conteúdo das capsulas em meio Ágar MRS *Lactobacillus* (Probac, São Paulo, Brasil).

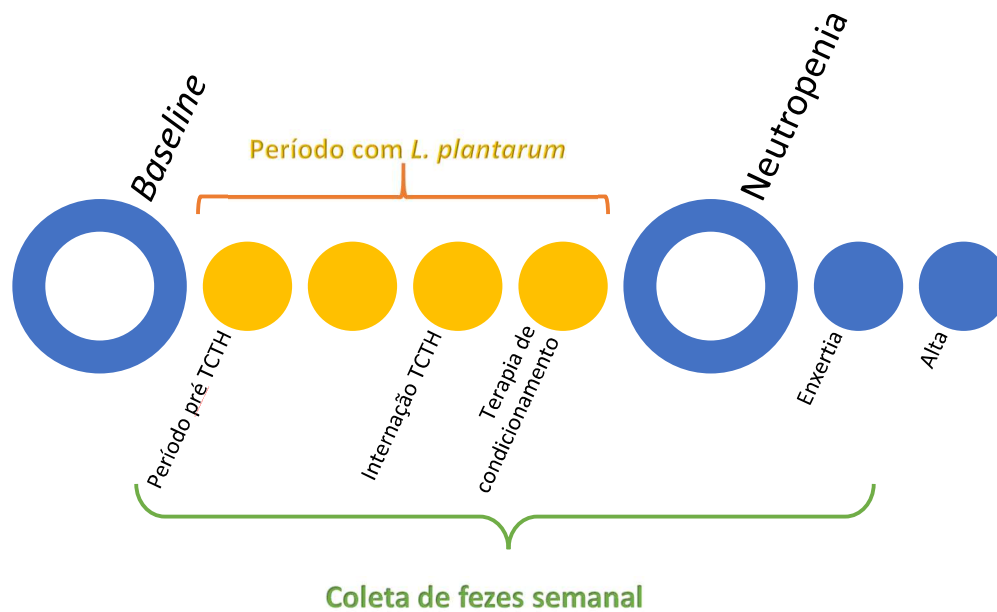


Figura 1. Linha cronológica do período de consumo de *L. plantarum* e coleta de material biológico para o estudo

3.5 Avaliação Laboratorial

Para análise de colonização por BMR, foram coletadas amostras de swab retal para cultura de vigilância e análise de reação de cadeia polimerase (PCR) para os principais genes de resistência *VIM*, *SPM*, *KPC*, *MCR-1*, *OXA-23*, *OXA-48*, *OXA-143*, *ESBL*, e *vanA* e *vanB*. A coleta do swab retal foi feita por enfermeiras do ambulatório e da enfermaria e a coleta de fezes feita pelo paciente em sua residência ou no ambiente hospitalar, quando hospitalizado. Após a coleta do swab retal, o material foi cultivado em meio seletivo e os isolados identificados para posterior análise de resistência.

Para a análise microbioma, amostras de fezes foram solicitadas semanalmente até a enxertia neutrofílica do TCTH, sendo a primeira delas antes do início do consumo de *L. plantarum*. A coleta do material fecal foi realizada em frasco estéril com guanidina como técnica já avaliada e estabelecida anteriormente por Ribeiro et al. (65). Os pacientes foram orientados a coletar as amostras de fezes, datá-las e acondicioná-las em freezer até a entrega do material.

3.5.1 Definição de bactérias multirresistentes

As seguintes BMR foram avaliadas: *Enterococcus* resistente à vancomicina, Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos e ou colistina e bactérias Gram-negativas não fermentadores (*P. aeruginosa* e *A. baumannii*) resistentes aos carbapenêmicos e ou colistina.

3.5.2 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Desde 2001 existe uma rotina na UCTC de coleta semanal de swab retal ou perianal para investigação de BMR. A coleta dos swabs para este estudo inicialmente foi realizada no mesmo dia de coleta da UCTC e posteriormente em dias diferentes para evitar falso negativo.

Inicialmente foi utilizado método de ágar-diluição com caldo *brain heart infusion* (BHI) com disco de meropenem para selecionar enterobactérias, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* e BHI com adição de vancomicina para seleção de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (ERV). Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos como *Acinetobacter* e *Pseudomonas* foram cultivadas em ágar MacConkey e os *Enterococcus* resistentes a vancomicina em meio ágar sangue. Para seleção de micro-organismos produtores de ESBL, inicialmente foi utilizado caldo BHI com disco de ceftazidima e posterior cultura em meio MacConkey.

A partir de agosto de 2019, as análises para ESBL utilizaram meio cromogênico (chromID™ ESBL, bioMérieux S.A., Marcy-l'Étoile, França) e houve teste de sensibilidade aos antimicrobianos através de disco-difusão. Os isolados que cresceram no meio cromogênico foram confirmados com POLISENSIDISC ESBL (D.M.E., São Paulo). Este teste contém cinco antibióticos (Amoxicilina/Ácido Clavulânico, AMC; Aztreonam, ATM; Ceftazidima, CAZ; Ceftriaxona, CRO; e Cefotaxima, CTX) para detecção de micro-organismos produtores de ESBL. A presença de um halo fantasma entre AMC e pelo menos um dos outros antibióticos testados é sugestiva de ESBL. A tabela 1 mostra os critérios interpretativos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) utilizados para interpretação dos testes de sensibilidades aos antimicrobianos, demonstrando os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco mensurado em milímetros por bactéria e antimicrobiano. Os isolados que apresentaram perfil de resistência aos

antibióticos testados foram submetidos ao teste de susceptibilidade à meropenem com o intuito de identificar a presença de carbapenemase. Aqueles resistentes ao meropenem foram avaliados com teste imunocromatográfico “RESIST-3 O.K.N. K-SeT” (Coris BioConcept, Gembloux, Bélgica) para identificação de *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}.

Tabela 1. Critérios interpretativos do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para interpretação dos testes de sensibilidades aos antimicrobianos com os diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor de cada disco mensurados em milímetros por bactéria e antimicrobiano analisado.

Micro-organismo	<i>Acinetobacter spp.</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Enterobacteriaceae</i>			<i>Enterococcus spp.</i>		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Disco Difusão												
Amoxicilina / Ácido Clavulânico AMC 30 (20/10)	-	-	-	-	-	-	18	14-17	13	-	-	-
Aztreonam ATM 30	-	-	-	22	16-21	15	21	18-20	17	-	-	-
Ceftazidima CAZ 30	18	15-17	14	18	15-17	14	21	18-20	17	-	-	-
Ceftriaxona CRO 30	21	14-20	13	-	-	-	23	20-22	19	-	-	-
Cefotaxima CTX 30	23	15-22	14	-	-	-	26	23-25	22	-	-	-
Meropenem 10	18	15-17	14	19	16-18	15	23	20-22	19	-	-	-
Vancomicina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17	15-16	14

S – sensível; I – Intermediário; R – resistente.

3.5.3 Identificação dos isolados

Os isolados foram identificados por meio de espectrometria de massa, (Matrix Associated Laser Desorption-Ionization technique -Time of Flight-MALDI-TOF MS), usando espectrômetro de massa Microflex (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

3.5.4 Detecção dos principais genes de resistência a antimicrobianos

Foi realizada PCR *multiplex* para detecção dos principais genes de resistência, genes de resistência aos glicopeptídeos e das principais ESBL utilizando as sequências de oligonucleotídeos descritas na tabela 2. A PCR *multiplex* foi realizada com DNA extraído através de *kit* comercial (illustra™ bacteria genomicPrep Mini Spin Kit, GE Healthcare; Reino Unido; sendo que para bactérias Gram-negativas foi utilizado o kit GenomicPrep™ and Tissue DNA

Isolation Kit, Amersham Pharmacia Biotech; Reino Unido), associado a primers (tabela 2), enzima *Taq polimerase*, desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) e MgCl₂, seguido de aquecimento para desnaturação, anelamento e extensão. Entre os Gram-negativos o gene amplificado foi submetido a uma purificação com o *kit* GFX™ PCR DNA e Gel *Band Purification* (GE-Healthcare, Reino Unido) conforme instruções do fabricante.

Para detecção dos genes de carbapenemases em *Pseudomonas aeruginosa* foram pesquisados os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{SPM}. Para detecção dos genes das oxacilinases em *Acinetobacter baumannii*, foram buscados *bla*_{OXA-23} e *bla*_{OXA-143}. Para resistência a glicopeptídeos em *Enterococcus*, os genes *vanA* e *vanB*. Para detecção genes de resistência relacionados a enzima KPC, foi pesquisado o gene *bla*_{KPC}. Para detecção de genes de resistência relacionados a produção ESBL, primeiro foi realizado teste fenotípico para triagem dos isolados e posterior análise genotípica através de PCR simples buscando *bla*_{CTXM8}, *bla*_{CTXM9}, *bla*_{CTXM2}, *bla*_{CTXM25}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para detecção dos genes de resistência

Gene	Sequências de oligonucleotídeos (5'-3')	Tamanho (bp)	Referência
<i>bla</i> _{OXA-23}	<i>bla</i> OXA23-F GATCGGATTGGAGAACCAGA <i>bla</i> OXA23-R ATTTCTGACCGCATTTCAT	501	(66)
<i>bla</i> _{OXA-143}	<i>bla</i> OXA143-F AGTTAACTTTCAATAATTG <i>bla</i> OXA143-R TTGGAAAATTATATAATCCC	604	(67)
<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> VIM-F TTTGGTCGCATATCGCAAAG <i>bla</i> VIM-R CCATTCAGCCCAGATCGGCAT	382	(68)
<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> SPM-F CCTTTTCCGCGACCTTGATC <i>bla</i> SPM-R ATGCGCTTCATTCACGCAC	798	(68)
<i>VanA</i>	<i>vanA</i> -F GCTGCGATATTCAAAGCTCA <i>vanA</i> -R CAGTACAATGCGGCCGTTA	545	(69)
<i>VanB</i>	<i>vanB</i> -F ATGGGAAGCCGATAGTCTC <i>vanB</i> -R GTTACGCCAAAGGACGAAC	368	(69)
<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> KPC-F ATGTCACTGTATCGCCGTCT <i>bla</i> KPC-R TTTTCAGAGCCTTACTGCC	893	(70)
<i>mcr-1</i>	CLR5-F CGGTCAGTCCGTTTGTTC CLR5-R CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309	(71)
<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> OXA-48-F TTGGTGCCATCGATTATCGG <i>bla</i> OXA-48-R GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	744	(72)
<i>bla</i> _{TEM}	TEM P F (234) TAAAATTCTTGAAGACGAA TEM CR F (233) GWGTCGCCCTTATTCCCT TEM R (235) - CCAAWGCTTAATCAGTGA	1066 839	(73)
<i>bla</i> _{SHV}	SHV F (246) TTATCTCCCTGTTAGCCRCC SHV R (247) TTAGCGTTGCCAGTGYTCGA	838	(73)
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	CTX-M-8 F (240) ATGAGACATCGCGTTAAG CTX-M-8 R (241) GGTGACGATTTTCGCGGCA	861	(74)
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-M-2 F (238) GACTCAGAGCATTGCGCCGC CTX-M-2 R (239) TCAGAAACCGYGGGTTACGA	870	(74)
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	CTX-M-9 F (242) TGACAAAGAGARTGCAACGG CTX-M-9 R (243) CGATGATTCTCGCCGCTGAA	857	(74)
<i>bla</i> _{CTX-M-25, e demais genes <i>bla</i>_{CTX-M}}	CTX-M-25 F (244) ATGAGAAAAAGCGTAAGGCGGG CTX-M-25 R (245) CCGTCGGTGACWATTCTG	865	(74)

3.5.5 Análise de clonalidade pela técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado

Para a detecção do perfil clonal dos isolados foi utilizado o método de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE). Os isolados foram semeados e incubados em aerobiose a 37°C por 24h. As amostras então foram ressuspensas em 1mL de solução salina estéril e homogêneas em agitador por 1 minuto e centrifugadas a 13000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido três vezes. O sedimento foi então pesado e ressuspenso em EDTA (25 mM pH 8,0), para uma concentração final de massa bacteriana de 100 µg/µL. Desta suspensão, 25µl foram transferidos para um tubo de micro-centrífuga contendo 225µl de tampão TEN (EDTA 0,5M, pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Deoxicolato de sódio), adicionado de 250 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, EUA) e 20 µl de solução de lisozima (100 µg/ml) (Sigma, EUA). Esta suspensão foi, então, transferida para os moldes e permaneceu por 30 minutos a 4°C, para que os blocos solidificassem. Após esta etapa, os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de células de 24 poços, contendo 2 mL de tampão EC (EDTA 0,5M, pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Deoxicolato de sódio) em cada poço e incubadas a 37°C por um período de cinco horas, sob agitação suave. Após a incubação, os blocos foram lavados com 2,5mL de tampão CHEF-TE para Gram-negativo (EDTA 0,5M pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0), e a seguir incubados com 1 mL de tampão ES (EDTA 625 nM pH 9,3; N-lauril sarcosil 5%) adicionado de 50µL de solução de proteinase K (20mg/ml) (Invitrogen, EUA) e incubados de 8h a 16h à temperatura de 50°C. Os blocos foram lavados com 2,5mL de tampão CHEF TE para Gram-negativo (EDTA 0,5M pH 7,0; EDTA 0,5M pH 8,0; Trisma base 1M pH 7,0; Trisma base 1M pH 8,0) com quatro lavagens com incubações de uma hora cada, e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese.

A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição SpeI e XbaI (*Thermo Fisher Scientific*, EUA) para os isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, respectivamente. Para o tratamento com

enzimas de restrição, um bloco de agarose de cada amostra foi transferido para uma placa de cultura de células de 96 poços contendo 200 µL de tampão. A seguir, o mesmo tampão foi retirado e novamente foram adicionados 200 µl do mesmo, o bloco foi incubado a temperatura ambiente durante uma hora. Este processo foi repetido quatro vezes. Após este período, o tampão foi substituído por 100 µL de uma solução o isolado contendo tampão específico da enzima usada para restrição do DNA do isolado.

A eletrofosere foi então realizada em gel de agarose a 1% (Sigma, EUA) em TBE 0,5x (90mM Tris, 90mM ácido bórico, 2mM EDTA [Amersham Pharmacia Biotech, EUA]), no equipamento CHEF DRIII System (Bio-Radcom, EUA) intervalos de tempo de pulso dependente do isolado estudado, em ângulo de 120°, à temperatura de 14°C e voltagem de 6,0 volts/cm.

A seguir, o gel foi corado em solução de gel red e fotografados sob luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFG (*New England Biolabs, Inc.*, EUA).

Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando-se o software de bioinformática Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths, bioMérieux, Bélgica). Fragmentos de DNA foram manualmente verificados e normalizados usando o peso *Lambda Marker* presente em cada gel. Uma tolerância de 1,5% e otimização de 1,5% foram utilizadas para a comparação de diferentes géis para *Klebsiella pneumoniae* e tolerância de 1% e otimização de 0,5% para os isolados de *Escherichia coli* (75,76). O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade. Na análise do dendrograma, para definir os PFT (*Pulsed Field Type*) e subtipos encontrados, os isolados com similaridade <80% foram considerados diferentes.

3.5.6 Microbioma

A composição da microbiota intestinal foi estudada nas amostras de fezes como descrito a seguir.

3.5.6.1 Extração de DNA das amostras fecais

A extração do DNA das amostras de fezes, foi realizada com o kit *PowerSoil® DNA Isolation Kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo instruções do fabricante, porém com algumas modificações que permitiram uma melhor adaptação do kit para a extração de amostras fecais, como descrito pelo *Human Microbiome Project* (77).

Foram transferidos 0,25g de fezes a um tubo *PowerBead*, presente no kit, devidamente identificado. O tubo foi homogeneizado por agitação vigorosa durante 30 segundos. Após a realização deste procedimento, a reação foi incubada a 65°C, durante 10 minutos e em seguida, 95°C durante 10 minutos, permitindo a lise adequada da amostra.

Posteriormente a incubação, 60 µL da solução C1 (para a lise celular) foram adicionadas ao tubo contendo a amostra. O tubo foi homogeneizado por inversão diversas vezes e em seguida, submetido a agitação vigorosa na posição horizontal, durante 10 minutos e, posteriormente submetido a centrifugação a 10.000g por 30 segundos. Em seguida, 250 µL da solução C2 foi adicionada a reação, que foi incubada durante 5 minutos a 4°C e centrifugada durante 1 minuto a 10.000g.

Logo após a centrifugação, 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 2mL. Logo após, 200 µL da solução C3 foram adicionados, e a reação incubada durante 5 minutos a 4°C. Em seguida, foi realizada a centrifugação durante 2 minutos a 10.000g.

Após a centrifugação, 750 µL do sobrenadante foram transferidos para um tubo de 2 mL. Logo após, 1200 µL da solução C4 foram adicionados, e a reação homogeneizada por vórtex. Aproximadamente 675 µL da solução foram transferidos para uma coluna presente no kit e foi realizada centrifugação durante 1 minuto a 10.000g. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o procedimento repetido por mais duas vezes.

Posteriormente, 500 µL da solução C5 foram adicionados à coluna, que foi submetida à centrifugação a 10.000g durante 30 segundos. O sobrenadante foi removido e uma nova centrifugação procedida a 10.000g durante 1 minuto.

Logo após a centrifugação a coluna foi inserida em tubo de 2 mL e, 100 µL da solução C6 (que por eluição separou os componentes, sendo que as moléculas de interesse foram adsorvidas a coluna) foram adicionados

diretamente ao centro da membrana da coluna. A coluna foi submetida a uma nova centrifugação durante 30 segundos a 10.000g.

O DNA extraído foi armazenado a -20°C até a realização do procedimento de quantificação do DNA e amplificação das sequências-alvo.

3.5.6.2 Quantificação do DNA

A quantificação de DNA foi realizada utilizando o fluorímetro de Qubit® 2.0 da empresa Invitrogen™(EUA). O fluorímetro de Qubit® é capaz de quantificar DNA, RNA e proteínas, através da utilização de fluorescência ultra-sensível e precisa. O cálculo da quantificação, baseia-se na relação de dois padrões utilizados na calibração do aparelho e que geram um ajuste de curva algorítmica. A quantificação do DNA extraído do material fecal foi realizado utilizando-se o Qubit® dsDNA BR Assay Kit.

Em um tubo de 0,5 mL foram adicionados 198 µL da Working Solution (199 µL de Qubit® dsDNA BR Buffer e 1 µL de Qubit® dsDNA BR Reagent) e 2 µL do DNA que foi agitado por vórtex, durante 2 segundos. Após um período de incubação de 2 minutos à temperatura ambiente, a quantificação foi realizada através do aparelho. O kit *Qubit® dsDNA BR Assay Kit* permite leituras que podem variar de 100 pg/µL até 1.000 ng/µL.

3.5.6.3 Amplificação das regiões-alvo

A caracterização da microbiota intestinal foi realizada pela amplificação do domínio V4 do segmento 16S ribossômico bacteriano, utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) F515 (5'-CACGGTCGKCGGCCATT-3') e R806 (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). Esses oligonucleotídeos foram modificados para conter uma região de adaptadores e estão demonstrados da tabela 3, permitindo o sequenciamento na plataforma *Ion PGM Torrent*. Além disso, um dos iniciadores (*primer forward*) foi marcado com sequências de nucleotídeos (*barcodes*), que permitiram a multiplexação de até 16 amostras em uma mesma reação de sequenciamento, de acordo com a cobertura desejada (250 mil leituras por amostra).

Tabela 3. Sequência de oligonucleotídeos modificados para conter uma região de adaptadores para plataforma Ion PGM Torrent.

R806_trP1_rev	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGATGGACTACHVGGGTWTCTA AT
F515_A_for_BC01	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTAAGGTAACGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC02	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAAGGAGAACGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC03	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGAAGAGGATTCGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC04	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTACCAAGATCGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC05	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCAGAAGGAACGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC06	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGCAAGTTCGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC07	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGTGATTCGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC08	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTCGATAACGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC09	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTGAGCGGAACGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC10	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGCTGACCGAACGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC11	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTCGAATCGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC12	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTAGGTGGTTTCGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC13	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAACGGACGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC14	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTTGGAGTGTCGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC15	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTAGAGGTTCGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA
F515_A_for_BC16	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAGTCTGGATGACGA TGTGCCAGCMGCCGCGGTAA

Para cada par de iniciadores, volumes iguais dos mesmos foram misturados, obtendo uma solução estoque de 10 μ M.

O reagente *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity* (Invitrogen™, EUA) foi utilizado para a etapa de amplificação das regiões-alvo. Este reagente contém uma mistura de DNA *polymerase*, sais, magnésio e dNTP's, permitindo uma rápida e eficiente amplificação dos produtos.

O DNA extraído de cada alíquota foi diluído para que se pudesse obter a concentração de 50 ng em um volume de 4 µL.

Em um tubo de 0.2mL, foram adicionados 45 µL de *Platinum® PCR SuperMix High Fidelity*, 4 µL de DNA genômico, além de 1 µL da solução estoque de 10 µM de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).

As condições esperadas que ocorreram para a amplificação das regiões-alvo do segmento V4 do gene 16S ribossomal, utilizando um termocilador Veriti (Applied Biosystems) foram:

- Um ciclo de 94°C, para a ativação da enzima, durante 3 minutos;
- Seguido de 40 ciclos de: desnaturação 94°C durante 30 segundos, anelamento 58°C durante 30 segundos e extensão 60°C durante 1 minuto.

3.5.6.4 Purificação dos produtos de PCR

Para a realização da purificação da biblioteca, o reagente *Agencourt® AMPure® XP Reagent* (Beckman Coulter, EUA) foi utilizado, permitindo uma remoção eficiente de dNTPs e *primers* não ligados à reação, dímeros de *primers*, sais, além de outros contaminantes, à partir da utilização de esferas magnéticas (*beads* magnéticas), que atraem os produtos de PCR, separando-os dos outros materiais.

Em um tubo 1.5 mL, devidamente identificado, foram adicionados 90 µL do reagente *Agencourt® AMPure® XP Reagent*, juntamente com 50 µL do produto de PCR de cada amostra. A mistura foi incubada durante 5 minutos, a temperatura ambiente, para a ligação do DNA às *beads* magnéticas.

Ao final da incubação, os tubos foram posicionados em uma estante magnética *DynaMag™-2 Magnet* (Invitrogen™, EUA) e incubados novamente por cerca de 2 minutos, até a solução apresentar-se límpida. Cuidadosamente, o sobrenadante foi removido, sem que o sedimento fosse desprendido, e 30 µL de etanol 70% recém-preparado foi adicionado, e a reação incubada por 30 segundos. Ao término da incubação, o sobrenadante foi removido sem que o

precipitado (*pellet*) fosse desprendido e o procedimento de lavagem com etanol a 70% repetido por mais uma vez.

Toda a solução de etanol do tubo foi removida e, em seguida, o tubo foi mantido em estante magnética para que ocorra a secagem das *beads*, através de incubação a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Após a incubação, 20 μL de tampão TE (tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM) foram adicionados a cada tubo contendo a amostra e homogeneizado com o auxílio da pipeta por 5 vezes. O tubo foi posicionado novamente em estante magnética incubado durante 1 minuto a temperatura ambiente.

Ao final, o sobrenadante contendo a biblioteca amplificada foi transferido para um novo tubo, devidamente identificado.

3.5.6.5 *Preparo do pool equimolar dos produtos amplificados*

Após a purificação dos produtos amplificados, as amostras foram quantificadas através da utilização do fluorímetro de Qubit® 2.0 da empresa Invitrogen™ (EUA), utilizando-se o *Qubit® dsDNA HS Assay Kit*, para determinar a concentração molar (nmol/L) de cada biblioteca.

Em um tubo de 0,5 mL foram adicionados 198 μL da *Working Solution* (199 μL de *Qubit® dsDNA HS Buffer* e 1 μL de *Qubit® dsDNA HS Reagent*) e 2 μL do DNA e se agitou por vórtex durante 2 segundos. Após um período de incubação de 2 minutos à temperatura ambiente, a quantificação foi realizada através do instrumento. O kit *Qubit® dsDNA HS Assay Kit* permite leituras que podem variar de 0,2ng/ μL até 100 ng/ μL .

Em seguida, após quantificação, todas as amostras foram diluídas para conter cerca de 310 milhões de moléculas/ μL , baseando-se no tamanho médio dos fragmentos gerados. Essa etapa tem o intuito de tornar as amostras equimolares utilizando a maior concentração possível. Após diluição de todas as bibliotecas, elas foram misturadas em volumes iguais (volume total de no mínimo 25 μL) para a realização da PCR em emulsão.

3.5.6.6 *PCR em emulsão, enriquecimento e carregamento do chip*

A etapa de PCR em emulsão foi realizada para que os fragmentos de DNA possam ser amplificados ao redor das *IonSphere™ Particles*, antes da deposição delas ao chip semicondutor para o sequenciamento.

Esta etapa foi realizada no *Ion Chef System*. Todos os insumos do kit *Ion PGM Hi-Q View Chef* foram alocados dentro do equipamento, seguindo protocolo do fabricante. A concentração dos fragmentos de DNA, ou seja, o *pool* equimolar das bibliotecas amplificadas foi inserido no cartucho de soluções na posição A e/ou B. Os chips de sequenciamento foram inseridos na centrífuga de chip do equipamento e identificados pela posição da centrífuga. O processo, também chamado de “corrida”, foi planejado e ao término, um dos chips foi guardado em geladeira dentro do recipiente para chips e o outro foi inserido no sequenciador, já inicializado, para o início do sequenciamento.

3.5.6.7 *Reação de sequenciamento*

A etapa de sequenciamento foi realizada também no *Ion Chef System*. Após o procedimento, todo o volume da reação foi inserido em um *chip* Ion 318™ *Chip* v2 (Thermo Fisher Scientific, EUA), seguindo instruções do fabricante. Após a o carregamento do chip, esse foi inserido no aparelho *Ion PGM Torrent* (Thermo Fisher Scientific, EUA) para realização do sequenciamento.

3.5.6.8 *Processamento de dados, anotação e análise estatística*

A análise de bioinformática do sequenciamento realizada previamente considerou 97% de similaridade entre as sequencias geradas para estabelecer a taxonomia, entretanto, ao se agrupar as sequencias por Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU), há uma possibilidade de reduzir a precisão e a variação biológica. Assim, implementamos uma nova estratégia de análise do microbioma, o pipeline DADA2 através do software QIIME2 (78). Essa técnica produz tabelas de alta resolução de variantes de sequência de *amplicons* (*amplicon sequence variants* - ASVs) não unindo sequencias por identidade e assim, produzindo menos sequências espúrias. O método DADA2 é mais sensível e específico do que os métodos OTU e foi apresentado em uma

publicação de 2016 e tem sido apontado como o melhor método de análise de microbioma (79,80).

As análises de alfa e beta diversidades foram também conduzidas no *software* QIIME2. A diversidade alfa é a diversidade taxonômica dentro de uma mesma população. Previamente estabelecemos os índices de diversidade alfa: Shannon, Simpson e Chao1, entretanto, para a nova análise usamos os índices de Shannon, Faith, Pielou e o número de espécies observado. Faith é um dos poucos índices que levam em consideração a árvore filogenética do microbioma das amostras avaliadas e Pielou considera a uniformidade das amostras. De acordo com Evangelista, Thomaz e Evangelista, a adoção de vários índices de diversidade melhora a análise do conjunto de dados, enfatizando tanto a riqueza, quanto a raridade/dominância (81).

O índice de Shannon mede o grau de incerteza em prever a que espécie pertencerá a um indivíduo escolhido, ao acaso, de uma amostra com S espécies e N indivíduos. Quanto menor o valor do índice de Shannon, menor o grau de incerteza e, portanto, a diversidade da amostra é baixa. A diversidade tende a ser mais alta quanto maior o valor do índice. Este índice é calculado por meio da

fórmula
$$H_s = - \sum_{i=1}^S n_i \ln n_i$$
, onde n_i : frequência de cada espécie, para i variando de 1 a S (Riqueza).

Para a análise da diversidade beta, diversidade taxonômica entre populações, foi realizada a análise de coordenadas principais (PCoA), baseada na matriz de distância Unifrac ponderado (weighted), que considera a filogenia, e Bray Curtis, que considera a abundância relativa dos micro-organismos no microbioma analisado.

3.6 Desfechos

A proposta primária foi a modulação do microbioma intestinal bacteriano a fim de descolonizar pacientes colonizados por bactérias multirresistentes com o uso do probiótico.

Secundariamente propomos a redução de infecção no TCTH e a segurança do consumo de *L. plantarum*.

3.7 Análise Estatística

A coleta e armazenamento dos dados foi feita através do software *Airtable* e as análises estatísticas no software R versão 3.6 (82,83). Variáveis categóricas foram descritas como contagens e proporções. Variáveis com distribuição normal e assimétrica foram descritas como média e desvio padrão, e mediana e intervalo interquartil, respectivamente. Normalidade foi avaliada através de inspeção visual de histogramas e através do teste de *Shapiro-Wilk*. O teste T de *Student* foi usado para comparações de variáveis com distribuição normal, e *Wilcoxon* para distribuições não normais. Variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui quadrado e teste exato de Fisher. Composição da comunidade microbiana foi resumida por proporção aos diferentes níveis taxonômicos, incluindo espécie, gênero, família, ordem, classe e filo. O teste de *Kruskal-wallis* foi usado para explorar diferenças nas métricas de alfa diversidade. As diferenças na composição da comunidade (diversidade beta) foram avaliadas usando testes não paramétricos de Análise de Semelhanças (ANOSIM). Para determinar as características mais prováveis de explicar as diferenças entre períodos e grupos, empregamos o algoritmo *Linear discriminant analysis Effect Size* (LEfSe). Análise de abundância diferencial das sequencias foi realizada usando a Análise de Composição de Microbiomas (ANCOM). Foi utilizado *Wilcoxon rank-sum test* e *Wilcoxon signed rank test*, ajustado pela correção de Bonferroni, para comparar sequencias entre grupos e períodos de coletas das amostras e teste exato de Fisher para comparar dados de descolonização. Para todas as análises a significância foi determinada como $p < 0,05$.

3.8 Fluxogramas do estudo

Fluxograma estudo piloto

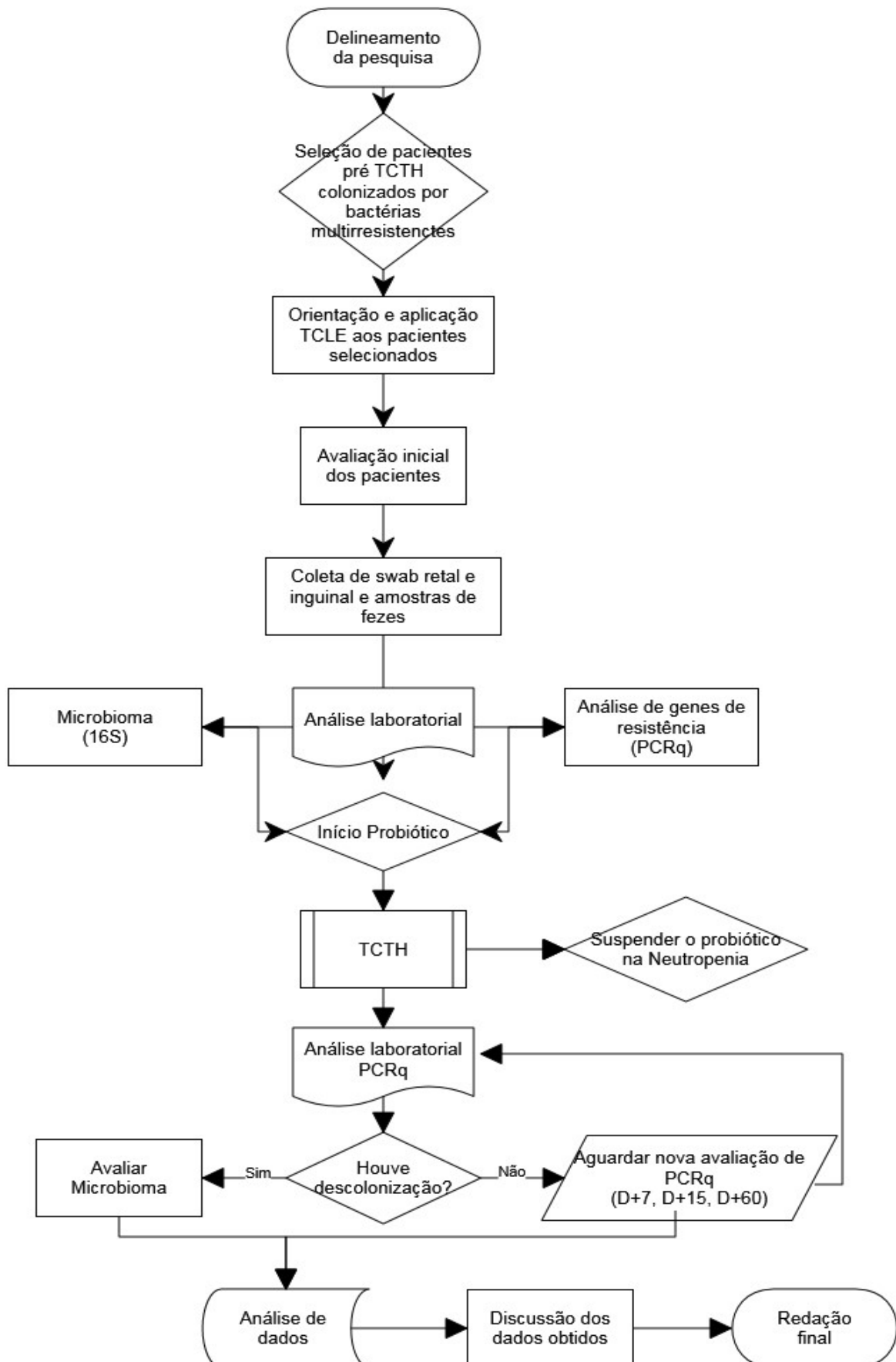


Figura 2. Fluxograma do estudo piloto

4.0 Resultados

4.1. Caracterização da população

A figura 3 apresenta o diagrama inclusão e exclusão de participantes do estudo de acordo com *Consolidated Standards of Reporting Trials* (CONSORT).

A tabela 1 apresenta as características clínicas dos participantes do estudo.

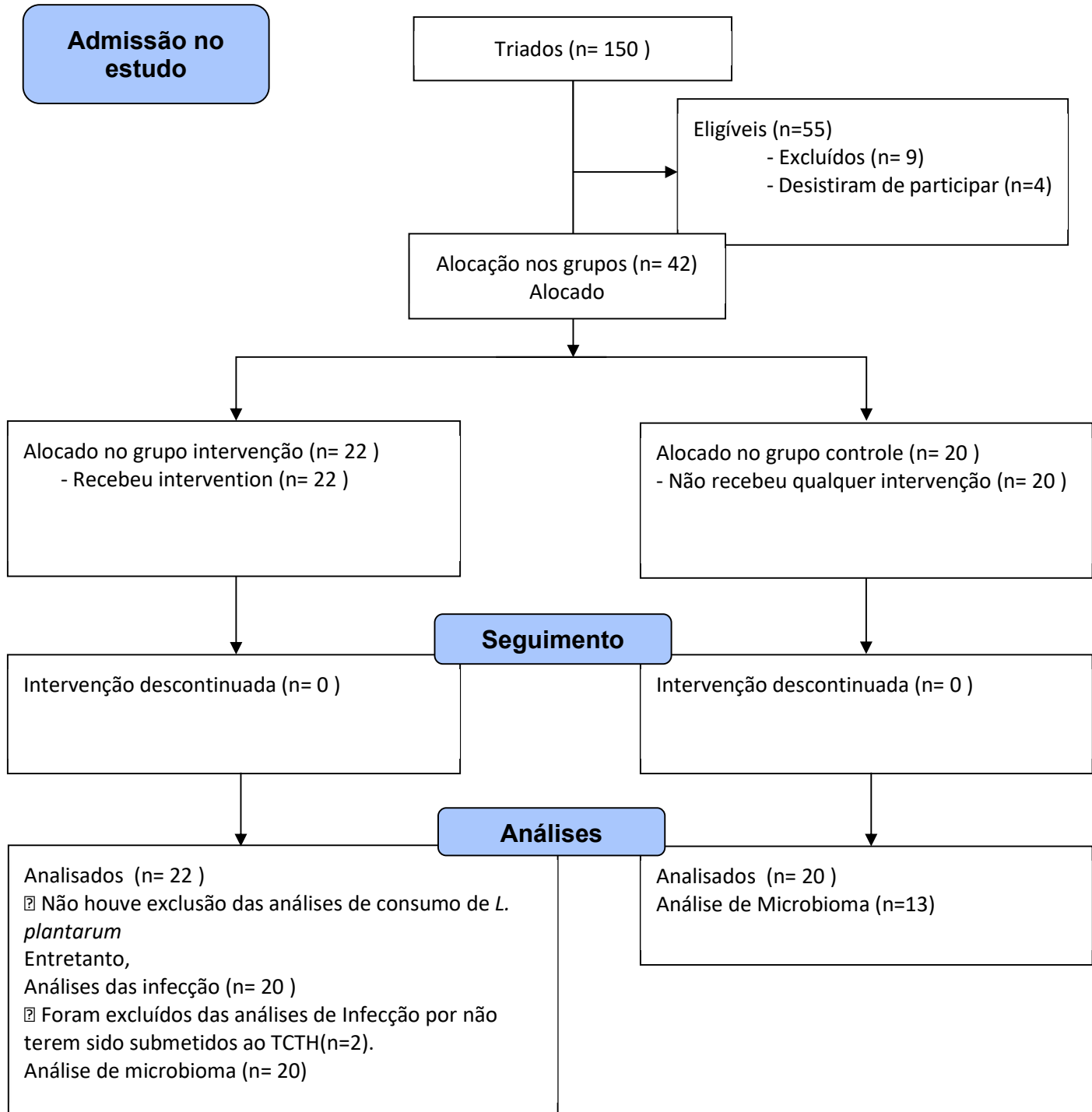


Figura 3. Diagrama do fluxo do estudo piloto

Tabela 4. Características clínicas, demográficas e do transplante da população estudada

Características da amostra	Grupo Intervenção	Grupo controle	p
	22	20	
Diagnóstico			
Gamopatias	6 (27%)	6 (30%)	1,00
Linfoma de Hodgkin	3 (14%)	4 (20%)	0,691
Linfoma Não Hodgkin	7 (32%)	5 (25%)	0,739
Leucemia Linfocítica Aguda	1 (0,5%)	2 (10%)	0,608
Leucemia Mieloide Aguda	4 (18%)	2 (10%)	0,608
Leucemia Mielóide Crônica	1 (0,5%)	0	1.000
Idade ao TCTH, mediana (mín-máx)	51 (22-67)	40 (22-70)	0,094
Gênero masculino	10 (46%)	12 (60%)	0,527
Colonização			
<i>Enterococcus resistente a vancomicina</i>	8 (36%)	11 (55%)	0,352
<i>Enterococcus resistente à vancomicina + Acinetobacter baumannii</i>	0	1 (0,5%)	0,488
<i>Enterococcus resistente à vancomicina + Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos</i>	5 (23%)	5 (25%)	1.000
<i>Enterococcus resistente à vancomicina + Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos + Acinetobacter baumannii</i>	4 (18%)	1(0,5%)	0,347
<i>Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos</i>	2 (0,9%)	1 (0,5%)	1.000
<i>Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos + E.coli resistente a carbapenêmicos</i>	1 (0,5%)	0	1.000
<i>E.coli + Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos</i>	1 (0,5%)	0	1.000
<i>Pseudomonas +Klebsiella pneumoniae resistente a carbapenêmicos</i>	0	1 (0,5%)	0,488
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1 (0,5%)	0	1.000
TCTH			
Autólogo	16 (73%)	16 (80%)	0,849
Alogênico	4 (18%)	4 (20%)	1.000
Não submetido a TCTH	2 (0,9%)	0	
Terapia de Condicionamento do TCTH			
Mieloablativa	18 (90%)	19 (95%)	1.000
Intensidade Reduzida	2 (10%)	1 (5%)	1.000
Tempo de hospitalização em dias, média (desvio padrão)	32,2 (±19)	26,8 (±14)	0,762
Autólogo	30,6 (±21)	22,4 (±8)	
Alogênico	38,3 (±6)	44,3 (±23)	
Tempo até enxertia em dias, média (mín-máx)	9 (4-21)	9 (6-14)	0,667
Toxicidades no TCTH			
Diarréia	15 (75%)	19 (95%)	0,815
Diarréia grave (graus III ou IV)	5 (25%)	1 (5%)	0,193
Mucosite	13 (65%)	17 (85%)	0,808
Mucosite grave (graus III ou IV)	8 (40%)	7 (35%)	1.000

¹ Transplante de Células tronco hematopoiéticas; ² Nós consideramos apenas pacientes submetidos ao TCTH; ³ Toxicidades gastrintestinais (mucosite e diarréia) foram mensuradas pelo *Commun Terminology Criteria for Adverse Events 5.0 version (CTCAE)*

4.2. Colonização por BMR

Todos os pacientes incluídos no estudo eram colonizados por BMR. Na avaliação antes do TCTH (mediana de 6 dias, intervalo interquartil de 7 dias), três (15%) dos 20 pacientes do grupo controle continuaram colonizados por ERV. No grupo intervenção, seis (27%) dos 22 pacientes mantiveram a colonização. Desses últimos, três eram colonizados por ERV e os outros três por Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos e a mediana de consumo de *L. plantarum* deles foi de 17 dias (Intervalo interquartil [IIQ] de 7) e 47 dias (IIQ 36), respectivamente. A mediana de dias entre o início do *L. plantarum* e a avaliação da descolonização foi de 19 dias (IIQ 47). Independentemente da intervenção, ambos os grupos tiveram uma redução na colonização por BMR durante o período. Não houve nova colonização por outros BMR durante o período de acompanhamento em ambos os grupos.

Após a retirada de *L. plantarum*, durante o período da neutropenia do TCTH, notamos um aumento da identificação de colonização com presença de genes de resistências de semelhante forma para ambos os grupos avaliados (tabela 5).

Não foi isolado nenhum *Acinetobacter baumannii* durante a pesquisa e os dois únicos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram de dois pacientes submetidos ao TCTH alogênico em uma terceira readmissão na enfermaria por complicações pós TCTH. Ambos os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram *bla*_{IMP}.

Tabela 5. Colonização por bactéria multirresistente a antimicrobianos dos pacientes incluídos no estudo por grupo de alocação, previamente à inclusão e após a retirada do *L. plantarum*, durante a neutropenia do transplante de células-tronco hematopoiéticas.

Paciente	Grupo	Colonização prévia				Colonização durante neutropenia do TCTH				
		ERV	KPC	Acinetobacter	Pseudomonas	Enterococcus	Klebsiella	Acinetobacter	Pseudomonas	E.coli
1	GI	1	0	0	0	0	0	0	0	NA
2	GI	1	1	0	0	Não realizou TCTH				
3	GI	0	1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
4	GI	1	1	1	0	NA	<i>bla</i> _{KPC}	0	0	NA
5	GI	0	1	0	0	0	NA	0	0	NA
6	GI	1	0	0	0	NA	0	0	0	NA
7	GI	1	0	0	0	NA	0	0	0	NA

Continua

Continuação

Paciente	Grupo	Colonização prévia				Colonização durante neutropenia do TCTH				
		ERV	KPC	Acinetobacter	Pseudomonas	Enterococcus	Klebsiella	Acinetobacter	Pseudomonas	E.coli
8	GI	1	0	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
9	GI	1	1	1	0	NA	NA	NA	NA	NA
10	GI	1	1	1	0	0	0	NA	0	NA
11	GI	1	1	0	0	vanA	0	NA	NA	NA
12	GI	1	1	0	0	0	0	NA	0	NA
13	GI	1	0	1	0	0	0	NA	0	NA
14	GI	1	1	0	0	0	bla _{KPC}	0	0	0
15	GI	0	1	0	1	0	0	0	0	0
16	GI	1	1	1	0	0	0	0	0	0
17	GI	1	0	0	0	0	bla _{KPC}	0	0	0
18	GI	0	0	1	0	0	0	0	0	0
19	GI	1	1	0	0	0	0	0	0	0
20	GI	1	1	0	0	0	0	0	0	0
21	GI	0	1	0	0	0	ESBL (bla _{TEM} , bla _{SHV})	0	0	0
22	GI	1	0	0	0	0	0	0	0	0
23	GC	1	0	0	0	NA	0	0	0	0
24	GC	1	0	0	0	NA	0	0	0	NA
25	GC	1	0	0	0	0	0	0	0	NA
26	GC	1	1	0	0	1*	1*	0	NA	NA
27	GC	1	0	0	0	NA	0	0	NA	NA
28	GC	1	0	1	0	1*	0	NA	0	NA
29	GC	0	1	0	0	NA	NA	NA	NA	NA
30	GC	1	0	0	0	0	0	0	0	ESBL (bla _{CTXM-2})
31	GC	1	1	0	0	1*	1*	NA	0	NA
32	GC	1	0	0	0	0	0	NA	0	NA
33	GC	1	0	0	0	0	0	NA	0	NA
34	GC	1	0	0	0	vanA	bla _{KPC}	0	0	0
35	GC	1	1	0	0	0	0	NA	NA	NA
36	GC	0	1	0	0	0	0	0	0	0
37	GC	1	0	0	0	0	0	0	0	ESBL (bla _{CTXM-2})
38	GC	1	0	0	0	0	ESBL (bla _{TEM})	0	0	0
39	GC	1	0	0	0	0	bla _{KPC}	0	0	0
40	GC	1	1	0	0	0	0	0	0	0
41	GC	1	0	0	0	0	0	0	0	0
42	GC	1	1	0	0	0	ESBL (bla _{TEM} , bla _{SHV})	0	0	0

1=Sim; 0= Não; GI = Grupo intervenção; GC= Grupo controle; NA = não avaliado; 1* = amostra avaliada pelo laboratório central do HCFMUSP por ágar diluição, sem análise de PCR; ESBL = Beta-lactamases de espectro estendido (do inglês, *extended-spectrum beta-lactamases*).

4.3. Infecções

Neutropenia febril ocorreu em 16/20 (80%) dos pacientes no grupo controle e 10/20 (52,6%) no grupo intervenção (p=0.14). No grupo intervenção, sete pacientes desenvolveram ICSADBM. Em comparação, no grupo controle ocorreram duas ICSADBM e duas ICS relacionada ao cateter (p=0.42). No grupo intervenção, cinco pacientes tiveram infecção por *Klebsiella pneumonia*, um dos quais era resistente a colistina e outro era *Klebsiella pneumonia* BMR. Três dos cinco pacientes do grupo intervenção que desenvolveram ICSADBM por *Klebsiella pneumonia* tinham sido colonizados por *Klebsiella pneumonia* resistente a carbapenêmicos. A paciente que desenvolveu ICS por *Klebsiella pneumonia* BMR evoluiu a óbito. Esta paciente apresentou menor adesão ao uso de *L. plantarum* (66%). Os agentes das infecções são descritos na tabela 6.

Tabela 6. Detalhamento das infecções de corrente sanguínea ocorridas nos pacientes submetidos ao transplante de células tronco hematopoiético.

	Grupo Intervenção (n=20)	Grupo controle (n=20)	P
Número de infecções	7 (35%)	4 (20%)	0.3008
ICS¹	0	2 (10%)	0.4872
Dias entre D0 do TCTH e a ICS (média)	5(±3)	8(±3)	
ICS durante neutropenia	5	4	
ICS durante o uso de <i>L. plantarum</i>	2*	-	
Dias sem <i>L. plantarum</i> (média)	1(±2)	-	
Agentes			
ICS-CVC²			
<i>Capnocytophaga sp</i>	0	1 (5%)	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0	1 (5%)	
ICSADBM³	7 (35%)	2 (10%)	0.0648
<i>Klebsiella pneumonia</i> BMR	1 (5%)	0	
<i>Klebsiella pneumonia</i>	2 (10%)	0	
<i>Enterobacter cloacae</i> complex e <i>Klebsiella pneumonia</i>	1 (5%)	0	
<i>Klebsiella pneumonia</i> e <i>Streptococcus oralis</i>	1 (5%)	0	
<i>Escherichia coli</i>	2 (10%)	1 (5%)	
<i>Escherichia coli</i> e <i>Streptococcus viridans</i>	0	1 (5%)	
Mesmo agente da colonização previa	3 (15%)	0	

¹ Infecção de corrente sanguínea (ICS); ² Infecção de corrente sanguínea relacionada ao acesso central (ICS-CVC); ³ Infecção de corrente sanguínea associada ao dano de barreira mucosa (ICSADBM); *ambos agentes *Klebsiella pneumonia*.

Dois pacientes que apresentaram infecção antes da retirada do *L. plantarum* (um deles um dia antes e o outro dois dias antes) provavelmente tiveram a adesão reduzida na última semana antes da neutropenia devido a terapia de condicionamento que pode induzir a náuseas e vômitos.

4.4. Clonalidade

Dentre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* (Figura 4) seis clusters diferentes foram observados. Não houve perfil clonal entre pacientes e os clones observados eram de isolados do mesmo paciente ao longo da internação do TCTH. O mesmo foi visto entre os isolados de *E. coli*. Na análise do dendrograma dos isolados de *E. coli* (Figura 5), foram incluídos também isolados provenientes de outros pacientes hospitalizados na enfermaria no período de acompanhamento deste estudo.

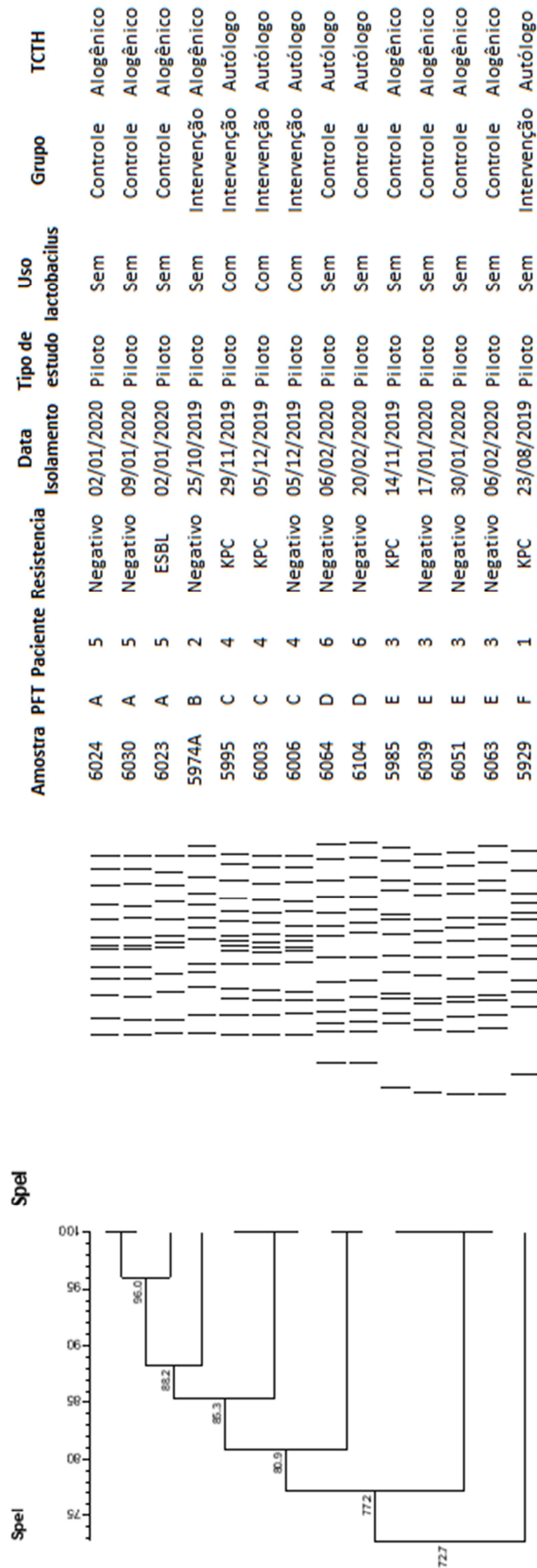


Figura 4. Dendrograma dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* identificados por PFGE.

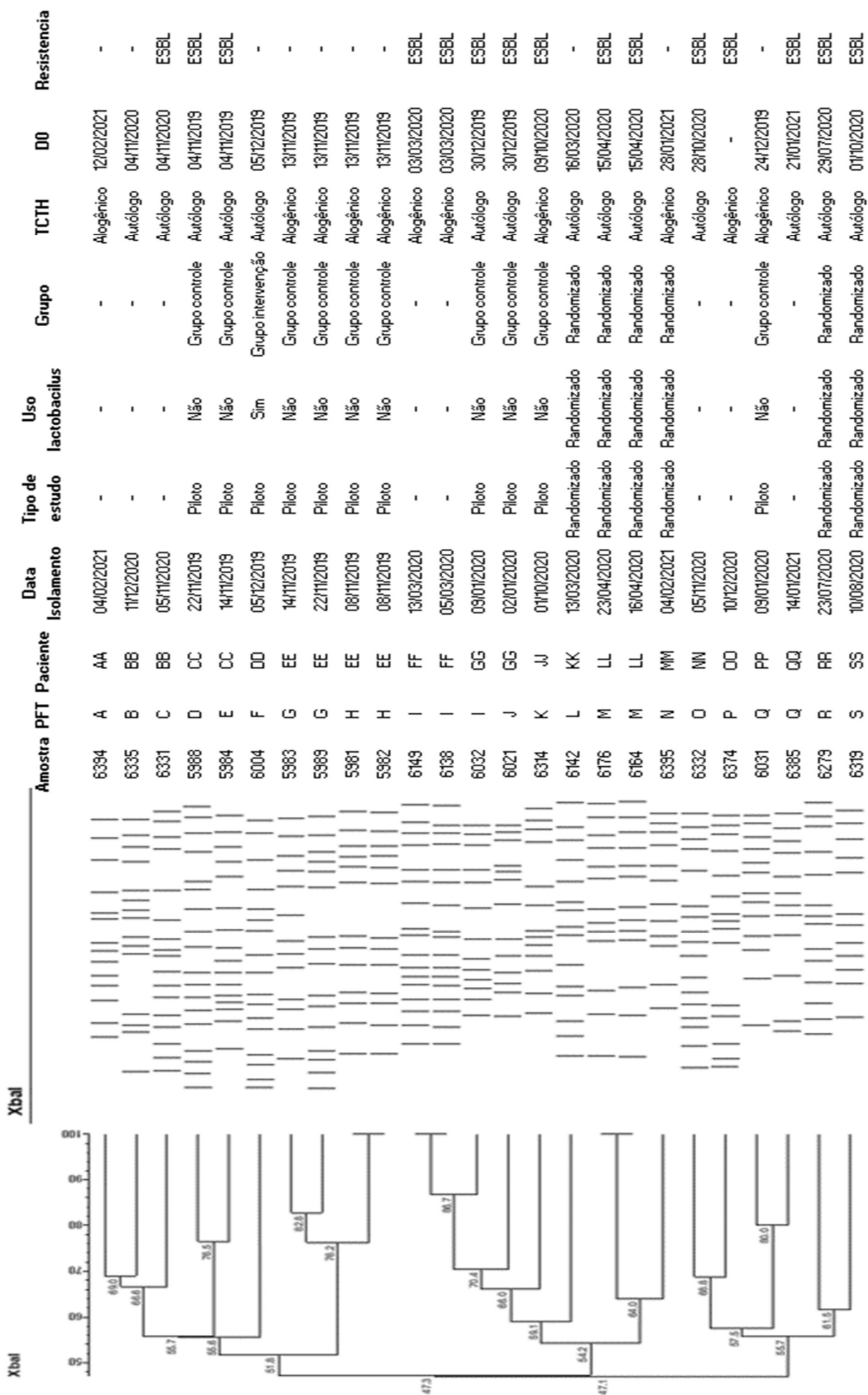


Figura 5. Dendrograma dos isolados de *Escherichia coli* identificados por PFGE.

4.5. Análise da quantidade de *L. plantarum* nas cápsulas

A análise das cápsulas de *L. plantarum* através de NGS mostrou abundância de *Lactobacillaceae*. Quando comparado a sequência (através de ASV) mais abundante das amostras com o *GenBank* (mantido pelo *National Center for Biotechnology Information* - NCBI)(84), encontramos 99% de identidade com *L. plantarum*. Além disso, a avaliação por espectrometria de massa mostrou correspondência com *L. plantarum* (score 2.175). Entretanto, a contagem das UFC demonstrou um déficit em relação a quantidade esperada por cápsula. A quantidade esperada era de 5×10^9 UFC/cápsula e a encontrada foi $6 \times 10^8 \pm 3.45 \times 10^8$ UFC. Como consequência, nós ajustamos a orientação para o paciente consumir duas cápsulas de *L. plantarum* duas vezes ao dia.

4.6. Adesão ao uso de *L. plantarum*

A adesão ao uso de *L. plantarum* foi de 89% ($\pm 10\%$) por 46 (± 29) dias. Sintomas como flatulência leve (grau 1 pelo CTCAE) ou moderada (grau 2) foram reportadas por três indivíduos. Dos 16 pacientes que reportaram fezes do tipo 3 pela escala de Bristol antes do consumo de *L. plantarum*, somente um permaneceu com tipo 3 após a intervenção, enquanto os outros 15 subsequentemente relataram fezes do tipo 4. Um paciente referiu fezes do tipo 2 antes, outro referiu tipo 5 e quatro relataram tipo 4, todos eles após a intervenção referiram fezes do tipo 4.

4.7. Microbioma

Os dados gerados dos sequenciamentos de microbioma foram depositados no NCBI (*National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*) sob o número de *Bioproject* PRJNA724885.

Conforme descrito na metodologia, estabelecemos uma nova análise de bioinformática, através do *pipeline* DADA2.

O resultado dessa análise foi um aumento da riqueza (número de táxons distintos detectados por amostra) e o número de sequências por amostra identificadas, que pode ser visualizado no gráfico de rarefação (Figura 6). Houve um incremento em cerca de 150 espécies observadas. Outra ferramenta

importante que foi utilizada foi a implantação do método de *machine learning* no DADA2 que “aprende” com as diferentes taxas de erro do conjunto de sequencias geradas e infere a verdadeira composição da amostra. A figura 7 traz as taxas de erro para cada transição possível (Adenina → Citosina, Adenina →Guanina,...) nos nucleotídeos sequenciados.

Figura 7. Taxas de erro para cada transição possível nos nucleotídeos sequenciados.

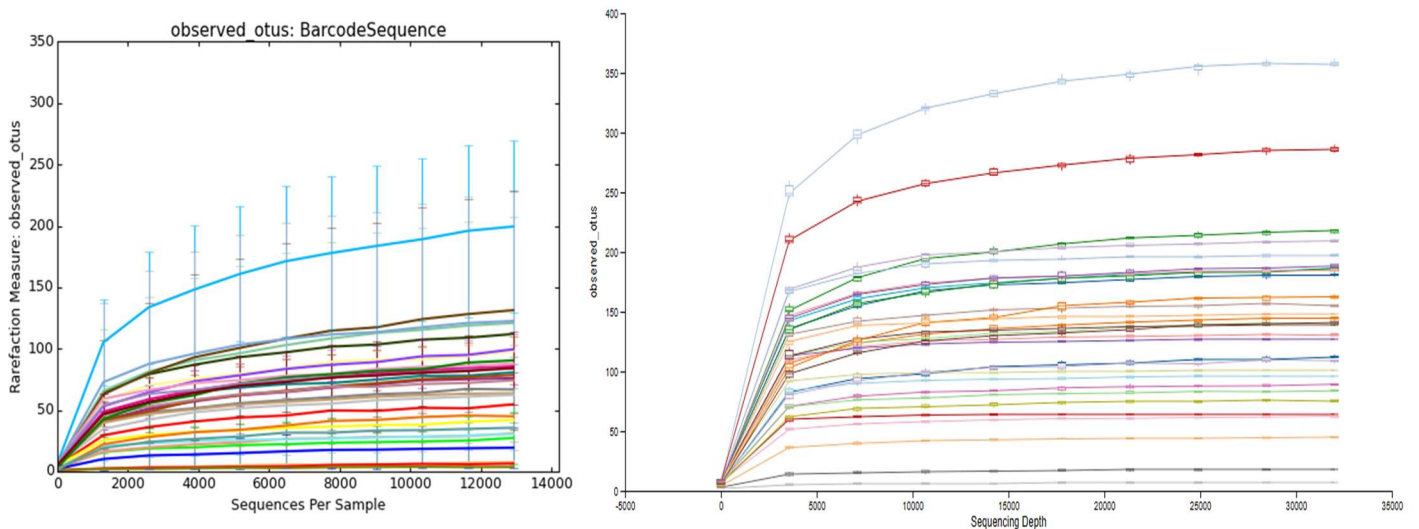
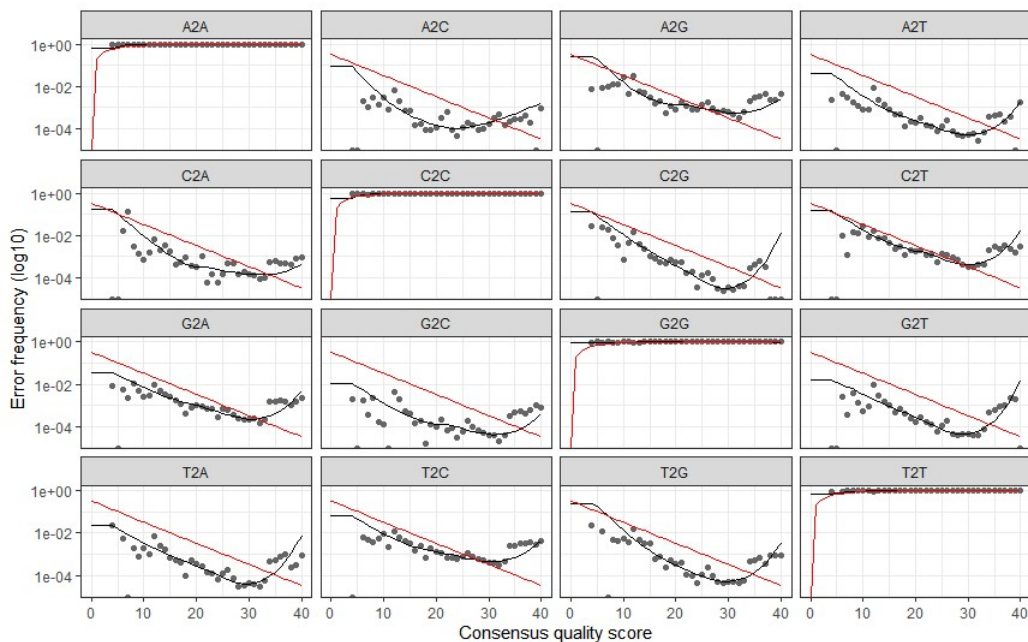


Figura 6. Curvas de rarefação por Unidades taxonômicas operacionais (A) e por Amplicon sequence variants (ASV) (B) das amostras sequenciadas



Os pontos equivalem as taxas de erro observadas para cada pontuação de qualidade de consenso. A linha preta mostra as taxas de erro estimadas após a convergência do algoritmo de aprendizado de máquina. A linha vermelha mostra as taxas de erro esperadas sob a definição nominal do Q-score. Aqui, as taxas de erro estimadas (linha preta) são um bom ajuste para as taxas observadas (pontos), e as taxas de erro caem com o aumento da qualidade, conforme esperado. Adenina(A), Guanina(G), Citosina (C), Timina (T), Uracila(U).

As amostras de fezes foram coletadas periodicamente entre os participantes do grupo controle (*baseline* n=13 e enxertia n=10) e entre os do grupo intervenção (*baseline* n=23, segunda semana de consumo de *L. plantarum* n= 22, na semana da neutropenia n=11, uma semana antes da infecção n= 4 e na enxertia n=10). Entretanto, nem todos os pacientes coletaram as amostras solicitadas em todos os períodos. Assim, amostras de 33 pacientes foram sequenciadas: 20 do grupo intervenção e 13 do grupo controle, totalizando 93 amostras. No geral foram obtidas 12.545.745 *reads* com uma média de 134.900 *reads* por amostra.

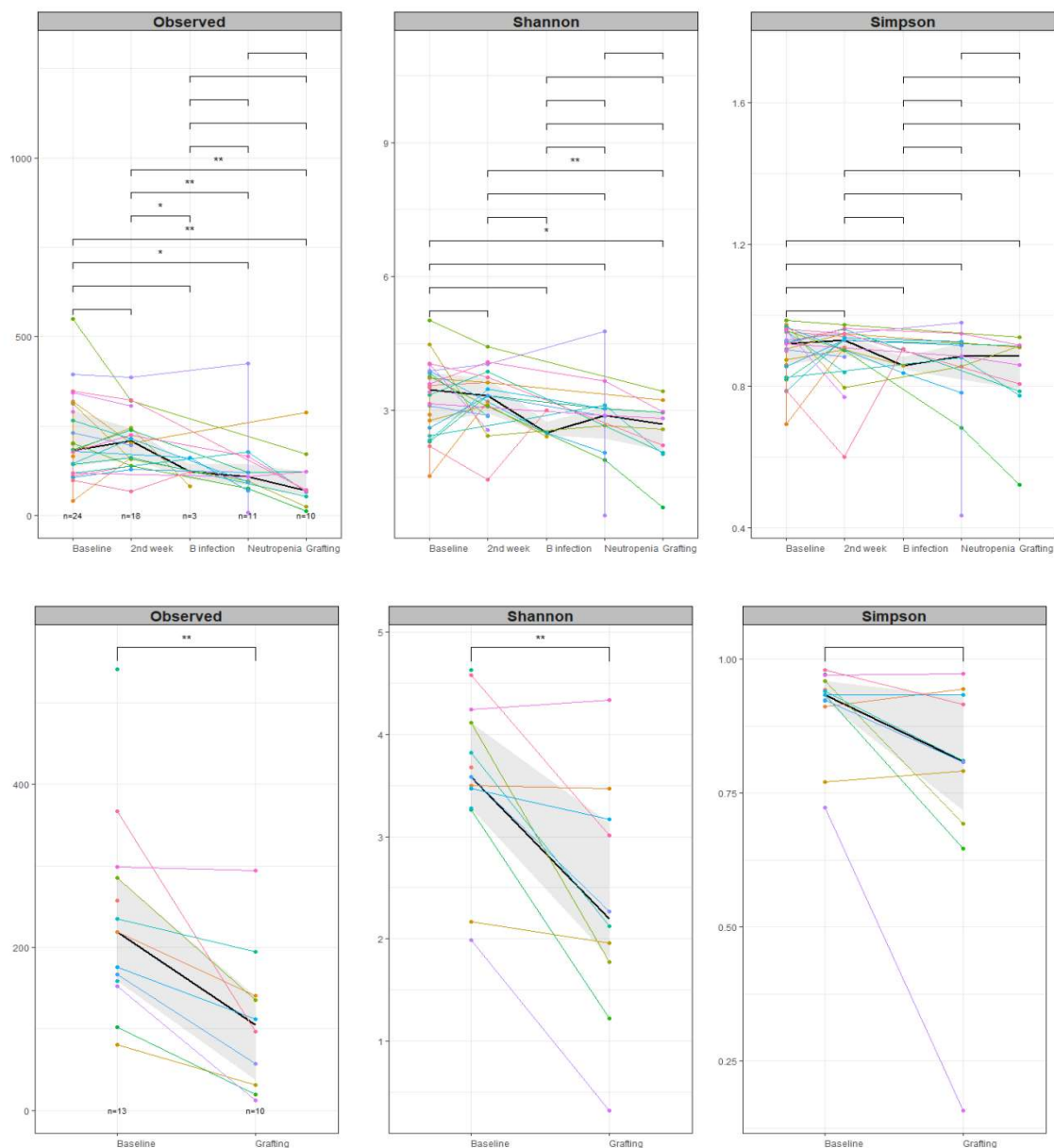


Figura 8. Alteração na diversidade alfa por ASV observado, Shannon, Simpson e índice de uniformidade de Pielou entre os pacientes de TCTH entre os períodos por grupos. Os índices de diversidade alfa foram testados para diferenças usando o teste de soma de postos de Wilcoxon (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). A linha contínua representa a mediana e a região sombreada os percentis 25 e 75.

No geral, houve redução da diversidade alfa (ASVs observados, Shannon e Simpson) para os pacientes entre os períodos, independente do uso de *L. plantarum*, com valores significativos principalmente entre o *baseline* e a segunda semana de *L. plantarum* versus neutropenia e enxertia (Wilcoxon $p < 0,05$ e $p < 0,01$) (Figura 8). Além disso, podemos ver uma intensa variabilidade intraindividual na diversidade alfa entre os períodos avaliados. A diversidade alfa por Faith diminuiu entre o *baseline* e a enxertia em ambos os grupos (GI $p = 0,0026$; GC $p = 0,018$). Não houve diferença significativa entre *baseline* e a diversidade alfa da segunda semana por Faith ($p = 0,80$), uniformidade de Pielou ($p = 0,83$) e Shannon ($p = 0,89$) após a intervenção (Figura 9).

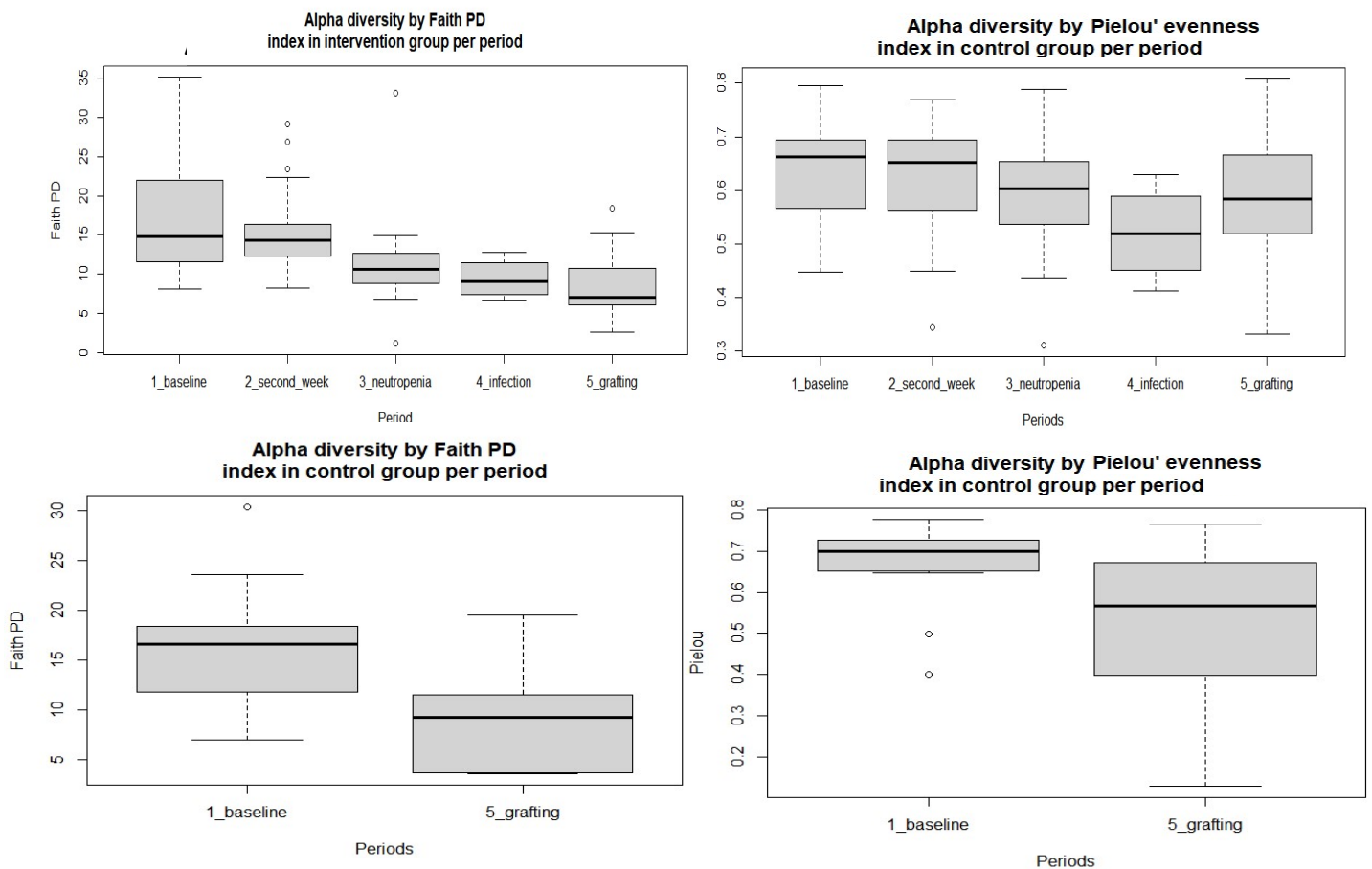


Figura 9. Diversidade alfa por Faith PD e Pielou evenness.

Ao analisarmos a composição tanto do GI quanto do GC, observamos que houve alteração significativa em seu bacterioma, qualitativa e quantitativamente, entre o *baseline* e a enxertia (ANOSIM - bray, unfrac ponderado e não ponderado $p < 0,05$) (Figura 10). Por outro lado, quando a composição bacteriana

de ambos os grupos foi comparada nesses dois pontos, não foram encontradas diferenças significativas (GI x GC na linha de base - ANOSIM unifrac $P = 0,409$, $R = 0,007$; bray $P = 0,181$, $R = 0,057$; wunifrac $P = 0,37$, $R = 0,01$); (GI x GC na enxertia - ANOSIM unifrac $P = 0,868$, $R = -0,056$; bray $P = 0,569$, $R = -0,022$; wunifrac $P = 0,837$, $R = -0,057$). Esses dados indicam que ambos os grupos tinham composições bacterianas semelhantes no *baseline* e que as alterações observadas na enxertia foram independentes do uso de *L. plantarum* e possivelmente relacionadas ao tratamento geral e aos procedimentos associados ao TCTH.

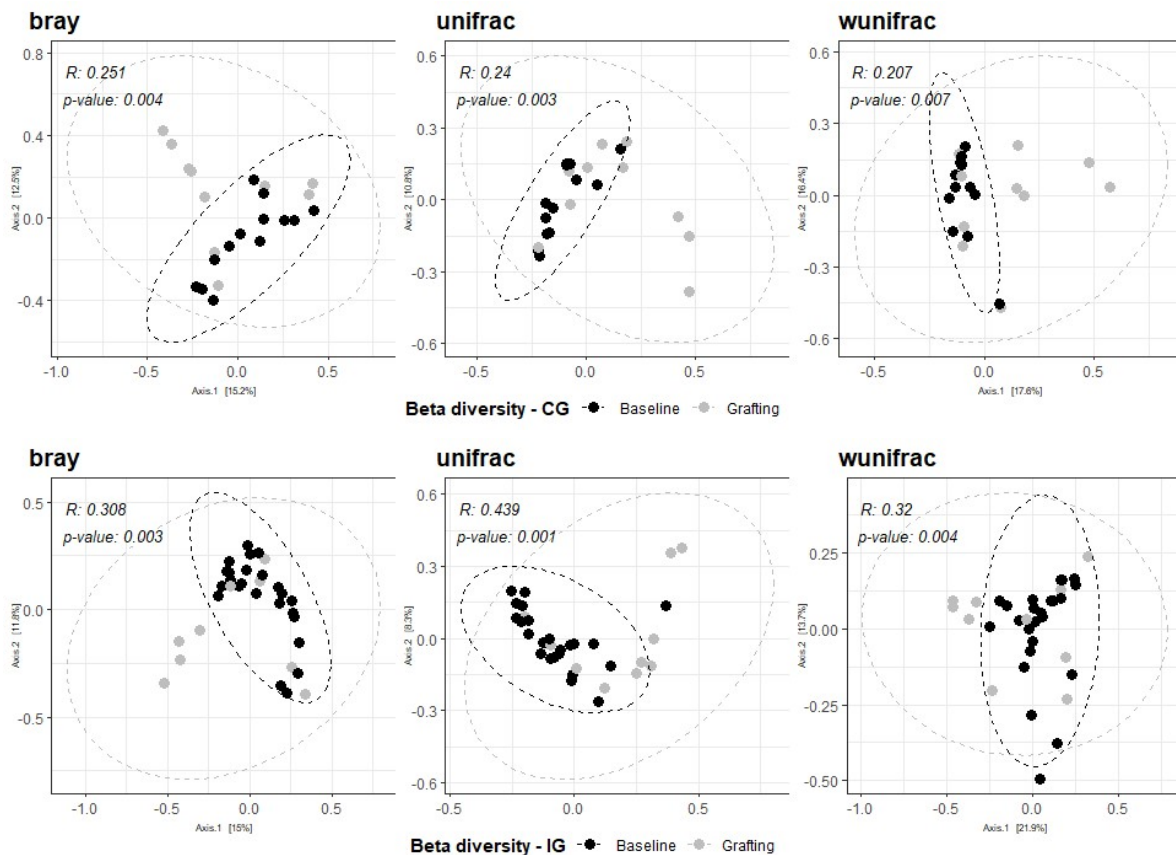


Figura 10. Medidas de diversidade beta de amostras de fezes dos grupos intervenção(IG) e controle(CG) (ANOSIM $p < 0,05$ foi considerado significativo) no baseline e na enxertia.

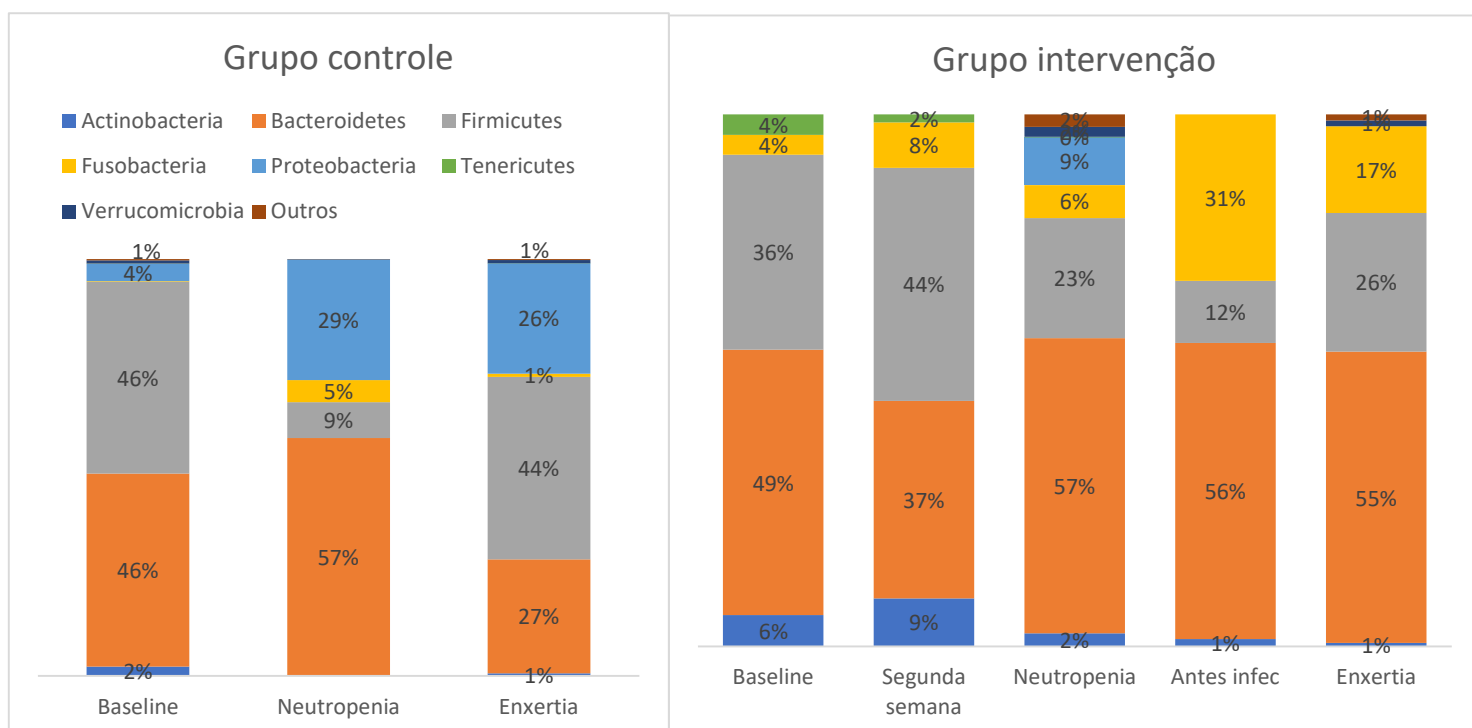


Figura 11. Abundância relativa dos filos no microbioma em amostras de fezes em diferentes períodos de coleta do transplante de células tronco hematopoiéticas.

No *baseline* pelo menos 50,9% das bactérias eram predominantemente dos filos Bacteroidetes, seguidos por Firmicutes (38,3%) e Proteobacteria (4,5%). Esses filos ainda eram predominantes na enxertia para GI e GC.

As Proteobactérias aumentaram em ambos os grupos entre o *baseline* e a enxertia ($p = 0,009$), sem diferenças significativas entre os grupos ($p = 0,41$). A detecção dos filos Firmicutes e Bacteroidetes foi comparável no GI e GC no início do estudo ($p=0,18$ e $p=0,72$, respectivamente) e após a enxertia ($p=0,50$ e $p=0,14$, respectivamente) (Figura 11).

Amostras de fezes de quatro pacientes que desenvolveram infecção foram coletadas uma semana antes da infecção ocorrer. Ao sequenciamento, um paciente que apresentou como agente infeccioso *Klebsiella pneumonia* apresentou uma semana antes da infecção uma dominação do microbioma por *Enterobacteriaceae* (abundância relativa maior ou igual a 30%). Dois outros pacientes tiveram aumento do gênero *Bacteroides*, um deles apresentou ICS por *E.coli* ESBL e outro por *Klebsiella pneumonia* BMR. O quarto pacientes tinha um aumento no gênero *Bacteroides* e na família *Ruminococcaceae* e posteriormente ICS por *Enterobacter cloacae* complex e por *Klebsiella pneumonia* sensível a antimicrobianos.

A ANCOM identificou o gênero *Weissella* (pertencente ao filo Firmicutes) como um diferencial na composição da abundância média microbiana dos táxons entre amostras dos grupos controle e intervenção. A ANCOM foi aplicada a todas as amostras, independente do grupo ou período do TCTH.

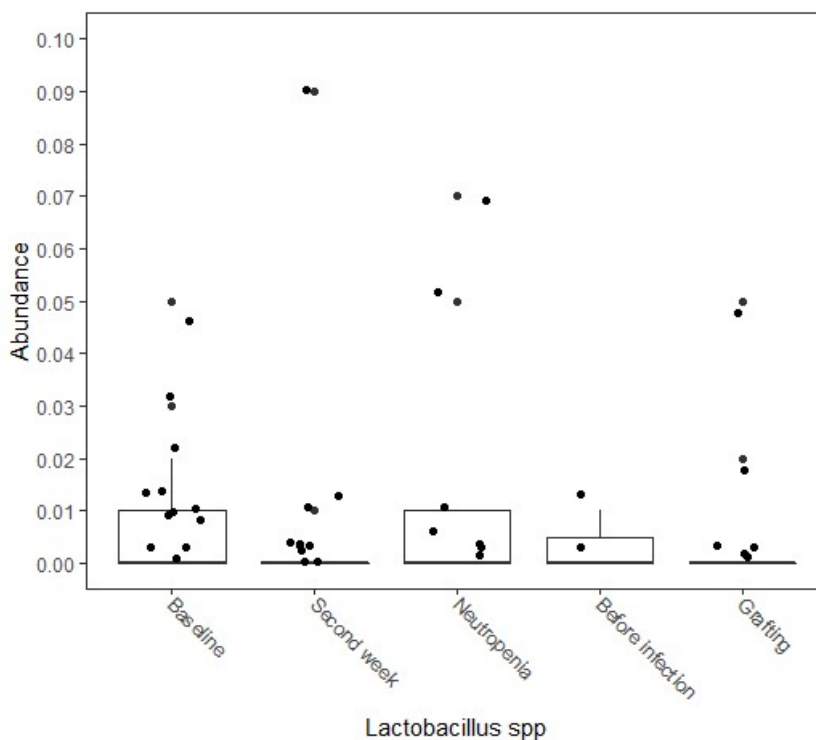


Figura 12. Presença de *Lactobacillus* ao longo do estudo entre amostras de fezes de participantes do grupo intervenção.

O consumo de *L. plantarum* foi associado ao aumento da presença de *Lactobacillales* ($p = 0,004$) na segunda semana. A presença de *Lactobacillus* foi avaliada nos diferentes períodos para o GI, e não foram observadas diferenças significativas, variando de 0 a apenas 0,09% (Figura 12).

As diferenças entre o *baseline* e a segunda semana medidas por LefSe com valor alfa para o teste fatorial Kruskal-Wallis $p < 0,05$ e LDA 2,0, mostraram aumento de *Lactococcus*, com diminuição de *Turicibacter* (Figura 13). A família *Lactobacillaceae* também foi identificada como diferentemente abundante quando o valor alfa do teste de Kruskal-Wallis foi de $p < 0,01$ e o LDA de 2,0. Já o escore LDA $> 3,0$ não apresentou características diferenciais com significância estatística (Figura 14).

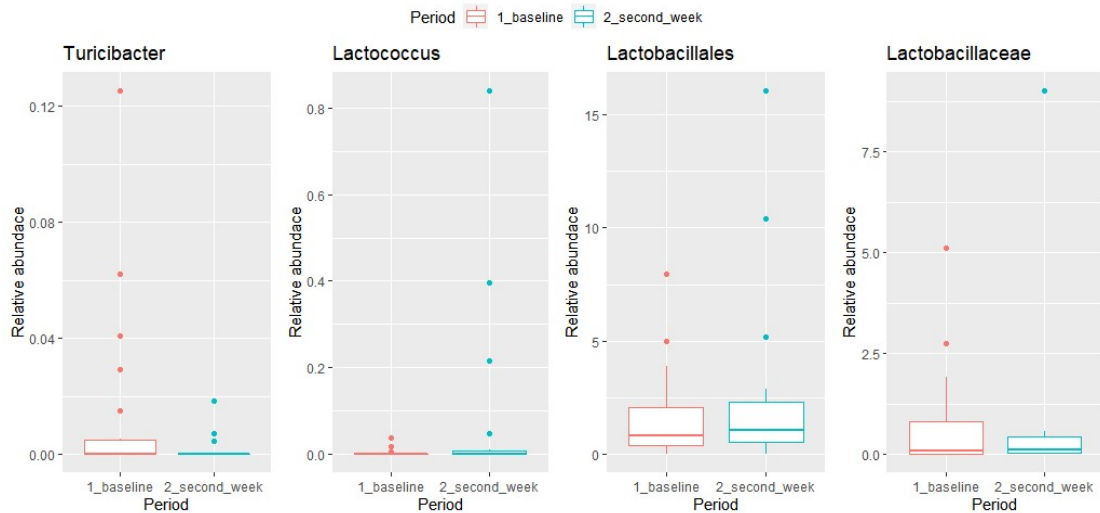


Figura 13. Abundância relativa de *Turicibacter*, *Lactococcus*, *Lactobacillaceae*, *Lactobacillales* entre o baseline e a segunda semana de consumo de *Lactobacillus plantarum*.

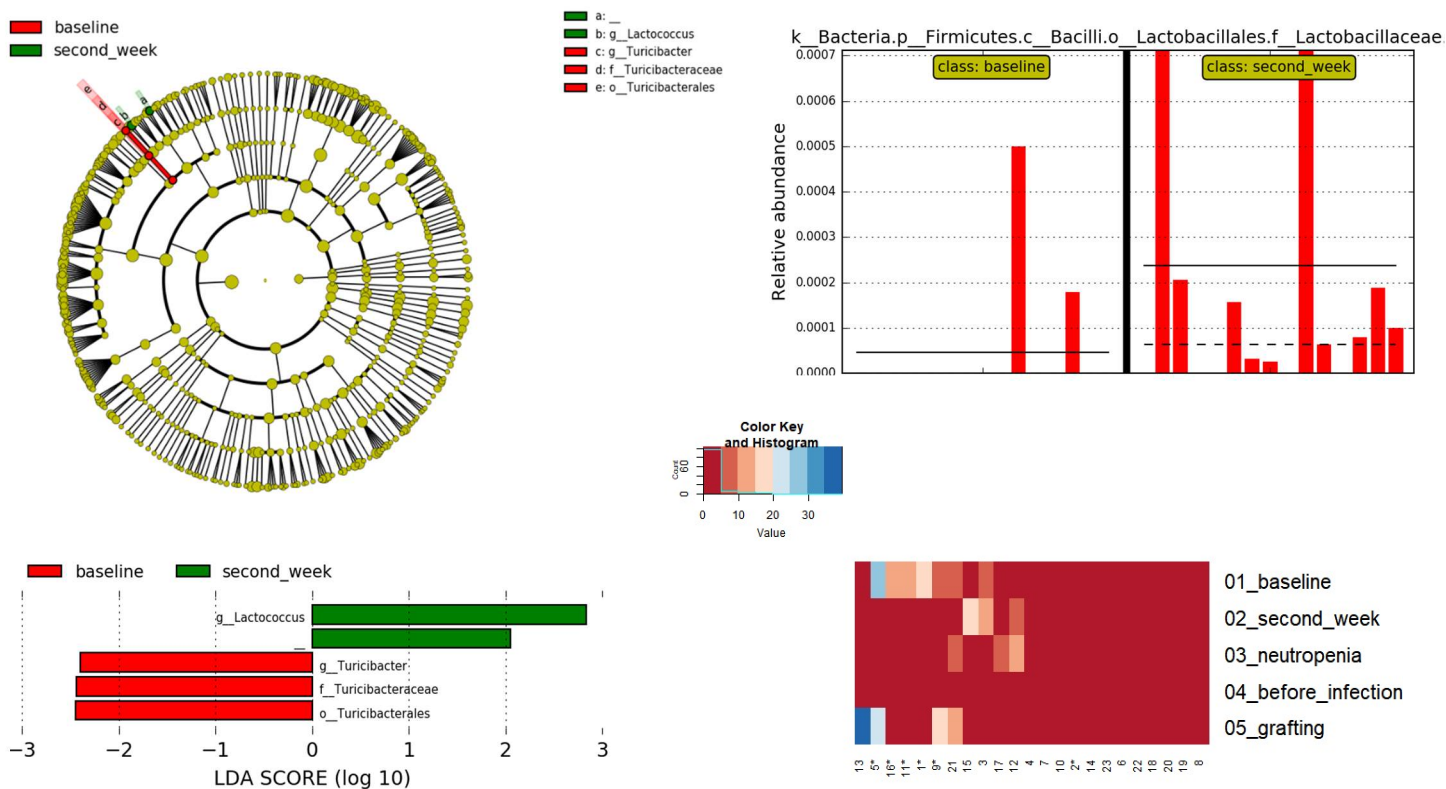


Figura 14. Os biomarcadores potenciais foram definidos pelo tamanho do efeito da análise discriminante linear (LefSe). (A) Cladograma para representação taxonômica de diferenças significativas entre o baseline e a segunda semana do consumo de *L. plantarum*. (B) LefSe demonstrando aumento da abundância da família *Lactobacillaceae* após duas semanas de *L. plantarum* (C) Histograma da pontuação da análise discriminante linear (LDA) para características diferencialmente abundantes entre o baseline e a segunda semana ($p < 0,05$ e pontuação LDA > 2 foram considerados significativos e são mostrados aqui com notação para sua taxonomia correspondente [g = gênero, f = família, o = ordem]). (D) Mapa de calor (heatmap) da abundância relativa de bactérias da ordem de *Lactobacillales* de pacientes nos grupos de intervenção e controle (*) entre os períodos avaliados.

Embora nenhuma bactéria com abundância diferencial tenha sido identificada entre GI e GC, ambos os grupos apresentaram uma diminuição na presença de *Roseburia* e *Coprococcus*, quando o *baseline* e a enxertia foram comparados (Figura 15).

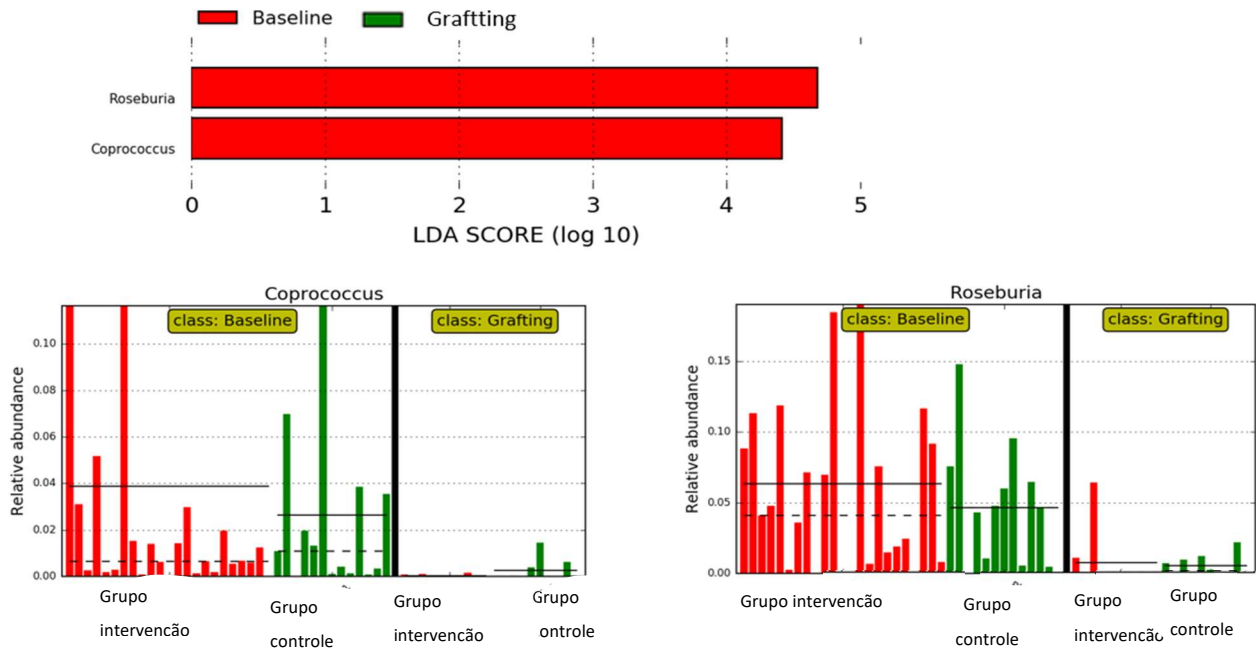


Figura 15. Biomarcadores potenciais foram definidos pelo tamanho do efeito da análise discriminante linear (LefSe) entre os períodos de *baseline* e enxertia. (A) LefSe demonstrando diminuição na presença de *Roseburia* e *Coprococcus* no período de enxertia em comparação com o *baseline*. (B) Histograma da análise discriminante linear (LDA) para características diferencialmente abundantes entre o *baseline* e a enxertia ($p < 0,05$ e a pontuação LDA > 4 foram considerados significativos).

Nos períodos avaliados, tanto o GI quanto o GC apresentaram aumento de *Enterobacteriaceae* ($p = 0,00046$), principalmente por *Enterococcus* ($p = 0,0041$) (Figura 16). Este táxon é responsável pelo maior número de infecções no GI. A análise da amostra pareada ($n = 10$), considerando os pacientes com fezes coletadas nos dois períodos (*baseline* e enxertia), não evidenciou diferenças significativas na abundância de *Enterococcus* ($p = 0,16$), provavelmente devido a suspensão do *L. plantarum* na neutropenia. Nenhuma diferença foi observada quando as amostras do *baseline* ($n=23$) foram comparadas com as amostras da semana anterior de infecção ($n=4$) ($p = 0,11$).

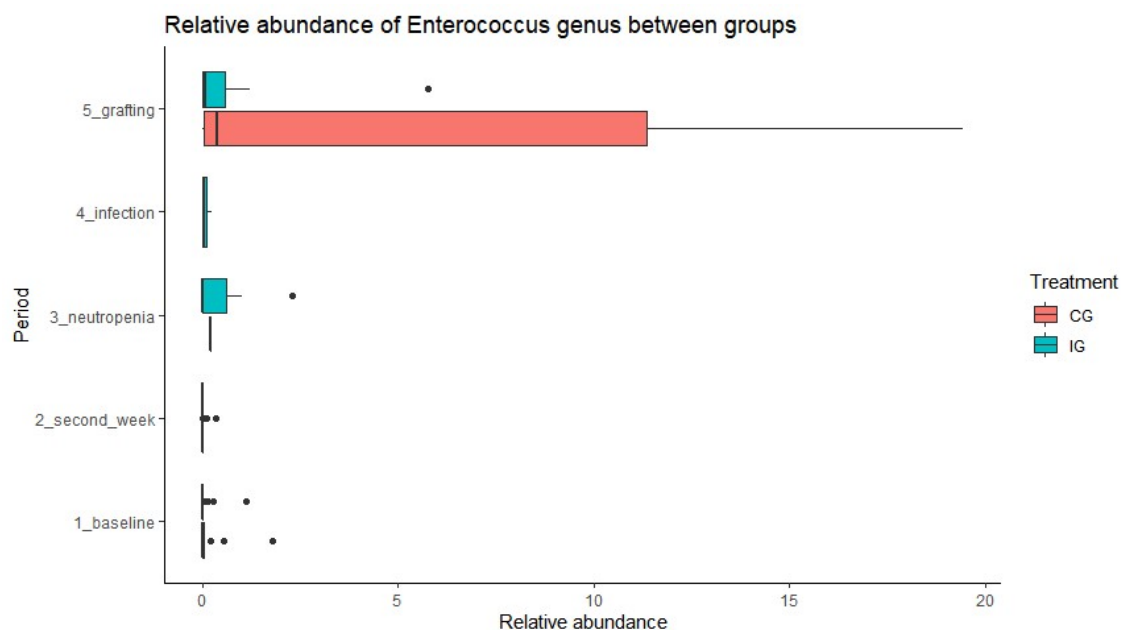


Figura 16. Abundância relativa do gênero *Enterococcus* no microbioma entre os grupos intervenção e controle durante o transplante de células tronco hematopoieticas.

4.8. Características Nutricionais

Tabela 7. Classificação do Estado Nutricional dos participantes no estudo do grupo controle e intervenção. HCFMUSP, 2017-2020.

Classificação do Estado Nutricional*	Grupo Intervenção		Grupo Controle		total
	N=22	%	N=20	%	
Baixo peso	0	0%	1	2%	1
Eutrofia	8	19%	6	14%	14
Sobrepeso	7	17%	7	17%	14
Obesidade	7	17%	6	14%	13

*Classificação de acordo com a idade (OMS/OPAS).

Todos os pacientes avaliados previamente ao TCTH pela ASGPPP tiveram a classificação de bem nutrido.

A abundância relativa entre os filos bacterianos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes ao longo dos períodos estudados são apresentados na figura 17 (grupo controle) e na figura 18 (grupo intervenção) não tendo sido encontrado diferenças significativas entre eles e o estado nutricional dos indivíduos. Da mesma forma, não foi encontrada diferenças significativas entre gêneros e espécies e o estado nutricional por LefSe.

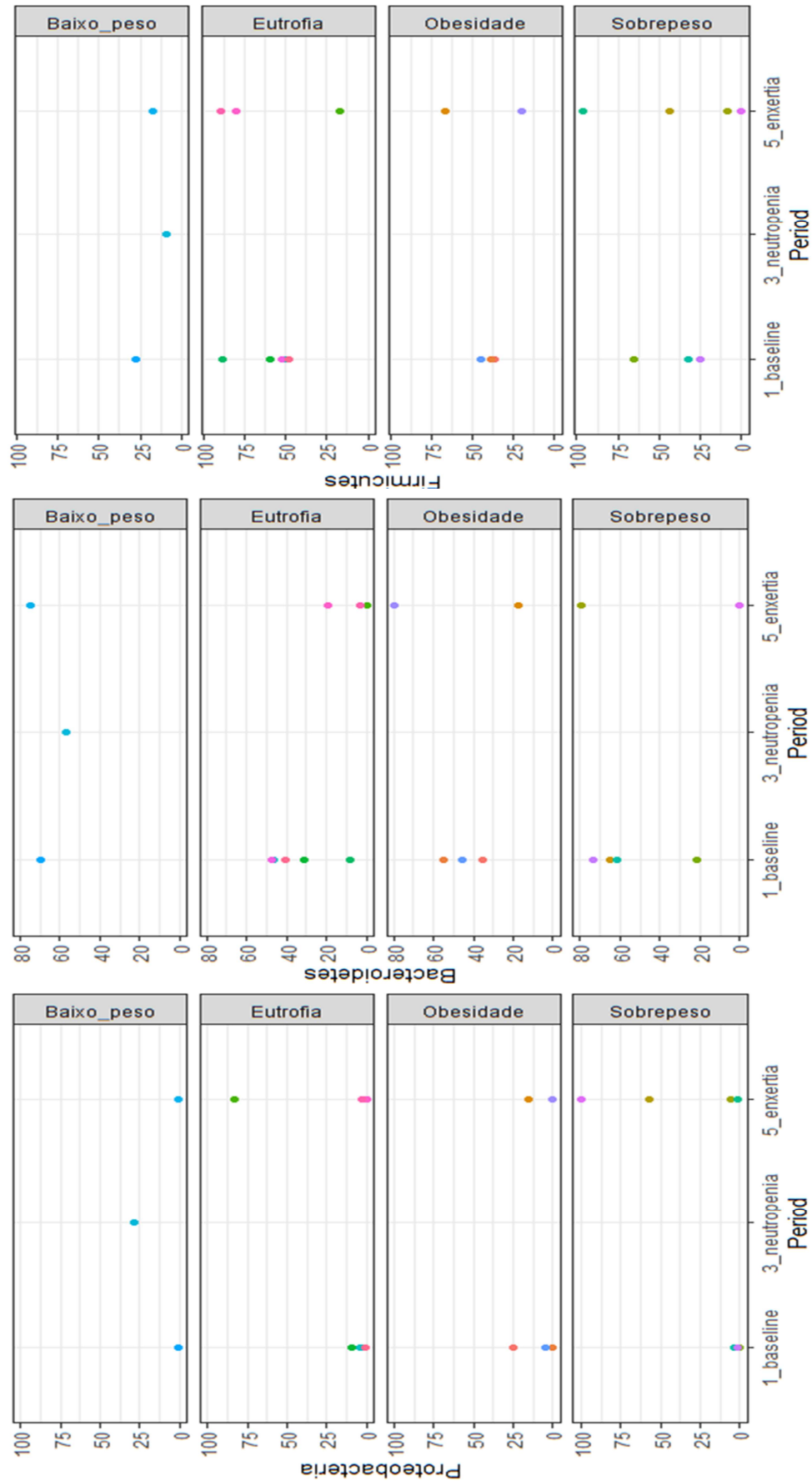


Figura 17. Abundância relativa dos filos bacterianos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes por indivíduo do grupo controle (cada cor de esfera representa um indivíduo), por períodos de acompanhamento e por estado nutricional.

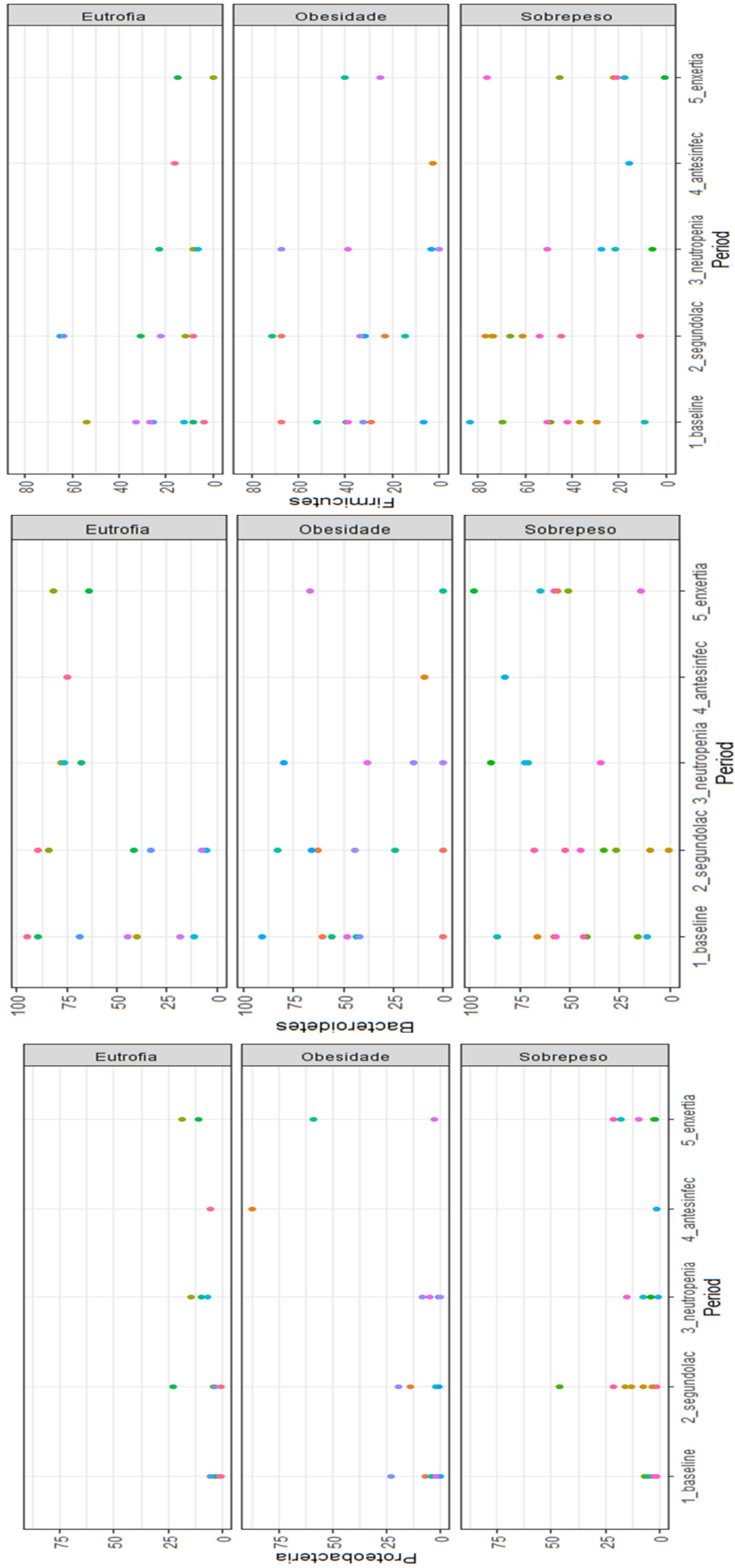


Figura 18. Abundância relativa dos filos bacterianos Proteobacteria, Bacteroidetes e Firmicutes por indivíduo do grupo intervenção (cada cor de esfera representa um indivíduo), por períodos de acompanhamento e por estado nutricional.

Discussão

No presente estudo, não observamos uma redução significativa na colonização ou infecção por BMR após a ingestão de *L. plantarum* em comparação com o grupo controle. No entanto, todas as infecções no grupo de intervenção foram ICSADBM, com a maioria delas ocorrendo durante a neutropenia e após a interrupção do uso de *L. plantarum*. Destaca-se que *L. plantarum* foi seguro e tolerável antes da neutropenia em todos os adultos e idosos submetidos ao TCTH e que pode reduzir, potencialmente, os níveis fecais do gênero *Enterococcus* em candidatos a TCTH. Houve diminuição da presença de *Roseburia* e *Coprococcus* em ambos os grupos no período de enxertia relacionado aos procedimentos do TCTH. Nenhum dos pacientes no grupo de intervenção teve ICS ou eventos adversos graves.

Embora a abundância de *Enterococcus* tenha sido maior no GC, não houve diferença significativa entre os grupos, provavelmente devido à cessação de *L. plantarum* na neutropenia. Um estudo prévio observou que o aumento de *Enterococcus* no microbioma no período da enxertia está associado à ICS durante o TCTH (19).

Não foram identificados diferenças na abundância dos táxons entre os períodos avaliados, exceto para *Lactococcus* e *Turicibacter* na segunda semana de uso de *L. plantarum* no grupo intervenção. Esses achados, embora estatisticamente significativos, provavelmente não são biologicamente relevantes devido à baixa frequência de ambos os táxons e porque essa mudança não foi estável ao longo dos períodos avaliados. Essas modificações podem ser explicadas pela variabilidade intraindividual do microbioma e outros fatores de confusão não avaliados aqui. No entanto, o aumento de *Lactococcus* pode ser digno de nota, pois esse gênero expressa um peptídeo antimicrobiano envolvido na homeostase intestinal humana e pode reduzir a colonização de ERV pela produção de lantibióticos (85,86). Kim et al. demonstraram em modelo animal e em amostras de fezes de pacientes de TCTH alogênicos que alta abundância de lantibióticos correspondia a baixa abundância de *E. faecium* e inibição de ERV. No entanto, os pesquisadores não conseguiram colonizar a microbiota dos ratos com *Lactococcus* (86).

Além disso, não foram observadas diferenças no consumo de *L. plantarum* nas amostras de fezes, independente do uso de *L. plantarum*. Isso é esperado, uma vez que a colonização e alterações no microbioma

gastrointestinal devido ao uso de probióticos têm sido descritas como extremamente variáveis entre os indivíduos, dependentes da microbiota preexistente e relacionada ao hospedeiro (87). Encontramos uma redução de *Roseburia* e *Coprococcus* entre as amostras de enxertia, independente do grupo avaliado. Tal condição tem sido relacionada com DECH devido à privação de butirato (88).

A comparação entre os valores de diversidade alfa do *baseline* e da segunda semana pós-ingestão não foi significativa, provavelmente porque alguns pacientes (n = 5) já haviam se submetido à terapia de condicionamento de TCTH nessa época, possivelmente reduzindo a diversidade nessas amostras.

A redução da uniformidade das espécies observadas entre o *baseline* e a semana antes da infecção pode ser sido ocasionada pela dominância de microorganismos patogênicos. A comparação da abundância da família *Enterococcaceae* (responsável pelo maior número de infecções nos pacientes do grupo intervenção) entre *baseline* e as amostras da semana anterior da infecção foi significativo, mostrando o impacto da alteração do microbioma intestinal e o risco de infecção.

Sem dúvida, o desequilíbrio microbiano intestinal contribui para a ocorrência de infecções. A redução dos valores de uniformidade de Pielou pode confirmar a dominância da espécie nas amostras antes da infecção. Ao longo do período de TCTH, houve redução da diversidade alfa no microbioma intestinal, conforme mostrado anteriormente por Taur et al. (19). Curiosamente, houve uma redução da uniformidade das espécies observada entre o *baseline* e a enxertia em ambos os grupos ligeiramente menor no grupo controle do que no grupo intervenção.

Ainda que o uso de *L. plantarum* tenha sido interrompido no período de neutropenia, foi possível notar diferenças nos filos entre os grupos controle e intervenção na enxertia. No momento da enxertia, houve uma correlação na diversidade beta entre as amostras, indicando uma composição de microbioma semelhante entre diferentes indivíduos.

Um aumento no filo Proteobacteria tem sido descrito como uma possível assinatura microbiana de doenças (89) e foi associado à ICS por BGN em TCTH quando era o táxon mais abundante (19). Somado a isso, estudos observaram

que o aumento do gênero *Enterococcus* no microbioma está associado à infecção de corrente sanguínea nos pacientes TCTH (19).

A família *Enterobacteriaceae*, principalmente *Klebsiella pneumoniae*, foi responsável pelo maior número de infecções em pacientes do grupo intervenção. Nós observamos uma dominação intestinal por *Enterobacteriaceae* em apenas um paciente que desenvolveu ICS. O grupo intervenção desenvolveu ICSADBM no período de neutropenia após o *L. plantarum* ser descontinuado e nas amostras desses indivíduos não encontramos membros da ordem *Lactobacillales*. Essas mudanças podem ser devido a interações entre *L. plantarum*, outros micro-organismos e metabólitos (90).

No presente estudo, tanto o grupo intervenção, quanto o grupo controle, apresentaram diminuição da proporção de BMR antes do TCTH. Possivelmente decorrente do uso prévio de antimicrobianos pelos tratamentos anteriores ao TCTH ou a descolonização espontânea. Heidenreich et al. (91) avaliaram pacientes colonizados por BMR após TCTH alogênico e os BMR tornaram-se indetectáveis após um tempo médio de seis meses.

É interessante notar que houve uma diferença na colonização entre a semana que antecedeu TCTH e a semana prévia a enxertia. Houve um aumento da positividade de BMR e genes de resistência principalmente entre os participantes do grupo controle (de três para 11 BMR). Um estudo de 2019 (92) mostrou que o resistoma de crianças italianas candidatas ao TCTH possui uma estrutura diferente daquele de indivíduos saudáveis, possivelmente moldada pela exposição prolongada a ambientes de saúde e sendo enriquecida em genes que fornecem resistência a macrolídeos. Quando foram submetidas ao TCTH, aquelas que apresentaram aquisição de novos genes de resistência no microbioma intestinal, somado aos genes de resistência já presentes previamente ao TCTH, desenvolveram DECH aguda (92).

Diferentemente de surtos e de disseminação de colonização por BMR (93) em unidades de saúde, neste estudo não foram encontrados perfis clonais entre os isolados de colonização dos pacientes estudados. Os clones encontrados pertenceram ao mesmo indivíduo.

Estudos tem demonstrado uma maior abundância de genes de resistência em indivíduos obesos quando comparados aos eutróficos, tanto entre crianças (94) quanto entre adultos (95). É conhecido que a estrutura do microbioma

intestinal de indivíduos obesos é diferente dos eutróficos pela maior abundância Proteobacterias, de Firmicutes e ainda de *Enterobacteriaceae*, e menor abundância de Bacteroidetes, correlacionando-se com disbiose (95,96). Entretanto, neste estudo não foi encontrada diferença entre filos e abundância relativa de gêneros e espécies bacterianas nos microbiomas avaliados no *baseline*. Possivelmente o microbioma de indivíduos obesos em tratamento oncológico é distinto daquele encontrado nos obesos saudáveis.

Este estudo tem limitações. A dose de *L. plantarum* nas cápsulas foi menor do que o esperado e, embora tenham sido feitos ajustes em sua administração, não podemos garantir que a quantidade de *L. plantarum* ingerida foi de 5×10^9 UFC. A duração do consumo de *L. plantarum* pelos pacientes variou de acordo com a disponibilidade do paciente e condição clínica para admissão ao TCTH. Não houve randomização dos participantes entre os grupos, o que pode gerar vieses na análise dos dados. O tamanho da amostra de indivíduos foi pequeno e não controlada por características clínicas que potencialmente poderiam influenciar os resultados. No entanto, não houve diferenças estatísticas relevantes nas mais importantes variáveis clínicas entre os dois grupos. A dificuldade em aumentar o número de pacientes recrutados é multifatorial e está relacionado principalmente à falta de vagas hospitalares para TCTH e dificuldades na obtenção de material biológico para análise do microbioma. No grupo de intervenção, nem todos os pacientes coletaram fezes semanalmente para análise do microbioma, por vezes, devido à diarreia, que é um sintoma bastante comum no TCTH.

Conclusão

- Houve uma modulação do microbioma no grupo intervenção (*L. plantarum*) com redução de *Enterococcus* e melhor diversidade alfa. Embora o *L. plantarum* possa ter potencial para reduzir os níveis fecais do gênero *Enterococcus*, não apresentou nenhum benefício adicional na descolonização por BMR em candidatos a TCTH.
- Houve diminuição da presença de *Roseburia* e *Coprococcus* em ambos os grupos no período de enxertia relacionado aos procedimentos do TCTH.
- A ingestão de cápsulas de *L. plantarum* foi segura e tolerável em pacientes de TCTH.
- Não foi encontrado perfil clonal entre os isolados das colonizações dos participantes da pesquisa.

Referências

1. Proctor SJ. Bone marrow transplantation. Allogeneic bone marrow transplantation. *Transpl Immunol*. 1994;2(2):153–4.
2. Curtis R, Rowlings P, Deeg H, Shriner D, Socie G, Travis L, et al. Solid cancers after bone marrow Transplantation. *N Engl J Med*. 1997;336(13):949–50.
3. Armitage JO. Bone Marrow Transplantation. *N Engl J Med* [Internet]. 1994 Mar 24;330(12):827–38. Available from: <https://doi.org/10.1056/NEJM199403243301206>
4. Wingard JR, Hsu J, Hiemenz JW. Hematopoietic Stem Cell Transplantation: An Overview of Infection Risks and Epidemiology. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011;25(1):101–16.
5. Young J-AH, Logan BR, Wu J, Wingard JR, Weisdorf DJ, Mudrick C, et al. Infections after Transplantation of Bone Marrow or Peripheral Blood Stem Cells from Unrelated Donors. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2016;22(2):359–70. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879115006382>
6. Wang L, Wang Y, Fan X, Tang W, Hu J. Prevalence of Resistant Gram-Negative Bacilli in Bloodstream Infection in Febrile Neutropenia Patients Undergoing Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Single Center Retrospective Cohort Study. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2015;94(45):e1931. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26559260>
7. Garnica M, Machado C, Cappellano P, Carvalho VVH, Nicolato A, Cunha C a., et al. Recomendações no manejo das complicações infecciosas no transplante de células-tronco hematopoéticas. *Rev Bras Hematol Hemoter* [Internet]. 2010;32:140–62. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842010000700020&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt
8. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for Preventing Infectious Complications among Hematopoietic Cell Transplantation Recipients: A Global Perspective. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2009;15(10):1143–238. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.06.019>
9. SBTMO. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea 2012. In: *II Reunião de Diretrizes da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea Angra dos Reis (RJ) Seleção de doador de medula óssea ou de sangue periférico para o transplante de células-tronco hematopoéticas* [Internet]. 2012. p. 4 a 6 de maio de 2012. Available from: http://www.sbtmo.org.br/userfiles/fck/Diretrizes_da_Sociedade_Brasileira_de_Transplante_de%0A_Medula_Óssea_2012_ISBN_978-85-88902-17-6.pdf
10. Oliveira AL, de Souza M, Carvalho-Dias VMH, Ruiz MA, Silla L, Tanaka PY, et al. Epidemiology of bacteremia and factors associated with multi-drug-resistant gram-negative bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2007;39(12):775–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17438585>
11. Mendes ET, Dulle F, Basso M, Batista MV, Coracin F, Guimarães T, et al. Healthcare-associated infection in hematopoietic stem cell transplantation patients: Risk factors and impact on outcome. *Int J Infect Dis*. 2012;16(6):424–8.

12. Bock AM, Cao Q, Ferrieri P, Young J-AH, Weisdorf DJ. Bacteremia in blood or marrow transplantation patients: clinical risk factors for infection and emerging antibiotic resistance. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2013;19(1):102–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22940054>
13. Bassetti M, Righi E. Multidrug-resistant bacteria: what is the threat? *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2013;2013:428–32.
14. Sun J, Chang EB. Exploring gut microbes in human health and disease: Pushing the envelope. *Genes Dis* [Internet]. 2014;1(2):132–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gendis.2014.08.001>
15. Shanmugam P, Meenakshisundaram J, Jayaraman P. BlaKPC gene detection in clinical isolates of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital. *J Clin Diagnostic Res*. 2013;7(12):2736–8.
16. Bilinski J, Robak K, Peric Z, Marchel H, Karakulska-Prystupiak E, Halaburda K, et al. Impact of Gut Colonization by Antibiotic-Resistant Bacteria on the Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Retrospective, Single-Center Study. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016;22(6):1087–93.
17. Ubeda C, Taur Y, Jenq RR, Equinda MJ, Son T, Samstein M, et al. Vancomycin-resistant Enterococcus domination of intestinal microbiota is enabled by antibiotic treatment in mice and precedes bloodstream invasion in humans. *J Clin Invest*. 2010;120(12):4332–41.
18. Halpin AL, de Man TJB, Kraft CS, Perry KA, Chan AW, Lieu S, et al. Intestinal microbiome disruption in patients in a long-term acute care hospital: A case for development of microbiome disruption indices to improve infection prevention. *Am J Infect Control*. 2016;44(7):830–6.
19. Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, et al. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):905–14.
20. Docampo MD, Auletta JJ, Jenq RR. Biology of Blood and Marrow Transplantation Emerging Influence of the Intestinal Microbiota during Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: Control the Gut and the Body Will Follow. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015;(March):1–7.
21. Walsh CJ, Guinane CM, O'Toole PW, Cotter PD. Beneficial modulation of the gut microbiota. *FEBS Lett* [Internet]. 2014;588(22):4120–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2014.03.035>
22. Holler E, Butzhammer P, Schmid K, Hundsrucker C, Koestler J, Peter K, et al. Metagenomic Analysis of the Stool Microbiome in Patients Receiving Allogeneic Stem Cell Transplantation: Loss of Diversity Is Associated with Use of Systemic Antibiotics and More Pronounced in Gastrointestinal Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2014;20(5):640–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2014.01.030>
23. Albenberg LG, Wu GD. Diet and the intestinal microbiome: associations, functions, and implications for health and disease. *Gastroenterology* [Internet]. 2014;146(6):1564–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24503132><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4216184>
24. Roesch LFW, Lorca GL, Casella G, Giongo A, Naranjo A, Pionzio AM, et al. Culture-independent identification of gut bacteria correlated with the

- onset of diabetes in a rat model. *ISME J* [Internet]. 2009;3(5):536–48. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2972309&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
25. Sinsheimer JS, Bocklandt S, Lin W, Sehl ME, Sa FJ, Vilain E. Epigenetic Predictor of Age. *PLoS One*. 2011;6(6):1–6.
 26. Valverde JR, Mellado RP. Analysis of Metagenomic Data Containing High Biodiversity Levels. *PLoS One*. 2013;8(3):1–10.
 27. Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* [Internet]. 2011;475(7356):348–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10242>
 28. Milani C, Hevia A, Foroni E, Duranti S, Turrone F, Lugli GA, et al. Assessing the Fecal Microbiota: An Optimized Ion Torrent 16S rRNA Gene-Based Analysis Protocol. *PLoS One*. 2013;8(7).
 29. Jünemann S, Prior K, Szczepanowski R, Harks I, Ehmke B, Goesmann A, et al. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by Ion Torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing. *PLoS One*. 2012;7(8).
 30. Karabudak S, Ari O, Durmaz B, Dal T, Basyigit T, Kalcioğlu MT, et al. Analysis of the effect of smoking on the buccal microbiome using next-generation sequencing technology. *J Med Microbiol*. 2019;68(8):1148–58.
 31. Fujimoto M, Moyerbrailean GA, Noman S, Gizicki JP, Ram ML, Green PA, et al. Application of ion torrent sequencing to the assessment of the effect of alkali ballast water treatment on microbial community diversity. *PLoS One*. 2014;9(9):1–9.
 32. Li H, Limenitakis JP, Fuhrer T, Geuking MB, Lawson M a, Wyss M, et al. The outer mucus layer hosts a distinct intestinal microbial niche. *Nat Commun* [Internet]. 2015;6(May):8292. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26392213>
 33. Peled JU, Gomes ALC, Devlin SM, Littmann, Taur Y, Sung AD, et al. Microbiota as Predictor of Mortality in Allogeneic Hematopoietic-Cell Transplantation. *N Engl J Med*. 2020;382(9):822–34.
 34. Ferreira AM, Moreira F, Guimaraes T, Spadão F, Ramos JF, Batista MV, et al. Epidemiology, risk factors and outcomes of multi-drug-resistant bloodstream infections in haematopoietic stem cell transplant recipients: importance of previous gut colonization. *J Hosp Infect* [Internet]. 2018;100(1):83–91. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.03.004>
 35. Turrone F, Ventura M, Buttó LF, Duranti S, O'Toole PW, Motherway MOC, et al. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: A *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. Vol. 71, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2014. p. 183–203.
 36. Andermann TM, Rezvani A, Bhatt AS. Microbiota Manipulation With Prebiotics and Probiotics in Patients Undergoing Stem Cell Transplantation. *Curr Hematol Malig Rep*. 2016;11(1):19–28.
 37. Trubiano JA, Worth LJ, Thursky KA, Slavin MA. The prevention and management of infections due to multidrug resistant organisms in haematology patients. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;79(2):195–207.
 38. Sánchez García M, Cambronero Galache JA, López Díaz J, Cerdá Cerdá E, Rubio Blasco J, Gómez Aguinaga MA, et al. Effectiveness and cost of selective decontamination of the digestive tract in critically ill intubated

- patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;158(3):908–16.
39. Buelow E, Gonzalez TB, Versluis D, Oostdijk EAN, Ogilvie LA, van Mourik MSM, et al. Effects of selective digestive decontamination (SDD) on the gut resistome. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(8):2215–23.
 40. van der Meer JW, Vandenbroucke-Grauls CM. Resistance to selective decontamination: the jury is still out. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(4):282–3.
 41. De Smet AMGA, Kluytmans JAJW, Blok HEM, Mascini EM, Benus RFJ, Bernards AT, et al. Selective digestive tract decontamination and selective oropharyngeal decontamination and antibiotic resistance in patients in intensive-care units: An open-label, clustered group-randomised, crossover study. *Lancet Infect Dis*. 2011;11(5):372–80.
 42. Diomed P. A. Decontamination of the digestive tract and oropharynx in ICU patients. Vol. 26, *Revista Chilena de Infectologia*. 2009. p. 570.
 43. Daneman N, Sarwar S, Fowler RA, Cuthbertson BH. Effect of selective decontamination on antimicrobial resistance in intensive care units: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2013;13(4):328–41. Available from: http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L71983463%0Ahttp://www.atsjournals.org/doi/pdf/10.1164/ajrccm-conference.2013.187.1_MeetingAbstracts.A3964 LK - <http://bj7rx7bn7b.search.serialssolutions.com?sid=EMBASE&issn=1073449>
 44. Buckner CD, Clift RA, Sanders JE, Meyers JD, Counts GW, Farewell VT, et al. Protective environment for marrow transplant recipients: a prospective study. *Ann Intern Med*. 1978 Dec;89(6):893–901.
 45. Vossen JM, Guiot HFL, Lankester AC, Vossen ACTM, Bredius RGM, Wolterbeek R, et al. Complete suppression of the gut microbiome prevents acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *PLoS One*. 2014;9(9).
 46. Andermann TM, Peled JU, Ho C, Reddy P, Riches M, Storb R, et al. The Microbiome and Hematopoietic Cell Transplantation: Past, Present, and Future [Internet]. Vol. 24, *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. Elsevier Inc.; 2018. p. 1322–40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2018.02.009>
 47. Taur Y, Jenq RR, Perales M, Littmann ER, Morjaria S, Ling L, et al. The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Vol. 124, *Transplantation*. 2014. p. 1174–82.
 48. Routy B, Letendre C, Enot D, Chénard-Poirier M, Mehraj V, Séguin NC, et al. The influence of gut-decontamination prophylactic antibiotics on acute graft-versus-host disease and survival following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Oncoimmunology* [Internet]. 2017;6(1):e1258506. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/2162402X.2016.1258506>
 49. Weber D, Jenq RR, Peled JU, Taur Y, Hiergeist A, Koestler J, et al. Microbiota disruption induced by early use of broad spectrum antibiotics is an independent risk factor of outcome after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;23(5):845–52.
 50. Zama D, Biagi E, Masetti R, Gasperini P, Prete A, Candela M, et al. Gut microbiota and hematopoietic stem cell transplantation: Where do we

- stand? [Internet]. Vol. 52, Bone Marrow Transplantation. Nature Publishing Group; 2017. p. 7–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2016.173>
51. Jenq RR, Ubeda C, Taur Y, Menezes CC, Khanin R, Dudakov JA, et al. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* [Internet]. 2012;209(5):903–11. Available from: http://jem.rupress.org/content/209/5/903.full.pdf&sa=U&ei=rE5mU4PME4GZyATE8oDQCQ&ved=0CEIQFjAH&usg=AFQjCNGxqGL_Pbxe87hVgC4C8iullU1Xaw
 52. Simms-Waldrup TR, Sunkersett G, Coughlin LA, Savani MR, Arana C, Kim J, et al. Antibiotic-Induced Depletion of Anti-inflammatory Clostridia Is Associated with the Development of Graft-versus-Host Disease in Pediatric Stem Cell Transplantation Patients. *Biol Blood Marrow Transplant* [Internet]. 2017;23(5):820–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2017.02.004>
 53. Kaysen A, Heintz-buschart A, Muller EEL, Narayanasamy S, Wampach L, Edric C, et al. Integrated meta-omic analyses of the gastrointestinal tract microbiome in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. 2017;
 54. Pineiro M, Stanton C. Probiotic Bacteria: Legislative Framework — Requirements to Evidence Basis 1, 2. 2007;4–7.
 55. Yang KM, Jiang ZY, Zheng CT, Wang L, Yang XF. Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci*. 2014;92(4):1496–503.
 56. Kikuchi Y, Yoshida H, Ogita T, Okita K, Fukudome S. In vivo dose response and in vitro mechanistic analysis of enhanced immunoglobulin A production by *Lactobacillus plantarum* AYA. 2015;34(3):53–8.
 57. Gerbitz A, Schultz M, Wilke A, Linde HJ, Schölmerich J, Andreesen R, et al. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: Let them eat yogurt. *Blood* [Internet]. 2004;103(11):4365–7. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L38685386%0Ahttp://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-11-3769>
 58. Oudhuis GJ, Bergmans DCJJ, Verbon A. Probiotics for prevention of nosocomial infections: Efficacy and adverse effects. Vol. 17, *Current Opinion in Critical Care*. 2011. p. 487–92.
 59. Klarin B, Johansson M, Molin G, Larsson A, Jeppsson B. Adhesion of the probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* 299v onto the gut mucosa in critically ill patients: a randomised open trial. 2005;9(3):285–93.
 60. Ladas EJ, Bhatia M, Chen L, Sandler E, Petrovic a, Berman DM, et al. The safety and feasibility of probiotics in children and adolescents undergoing hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* [Internet]. 2015;51(August):1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26569091>
 61. CDC - Center for Disease Control and Prevention. Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central line-associated Bloodstream Infection). Publ on-line <http://www.cdc.gov/nhsn/> [Internet]. 2016;(January):1–32. Available from: Centers for Disease Control (CDC)/National Healthcare Safety Network (NHSN). Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated

- Bloodstream Infection and Non-central line-associated Bloodstream Infection.. Available at: <http://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscM>
62. Services H. Common Terminology Criteria for Adverse Events v3.0 (CTCAE). In: Principles and Practice of Clinical Trial Medicine [Internet]. 2008. p. 461–533. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123736956000223>
 63. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*. 2016;65(1):57–62.
 64. Lewis SJ, Heaton KW. Stool form scale as a useful guide to intestinal transit time. *Scand J Gastroenterol*. 1997;32:920–4.
 65. Ribeiro RM, de Souza-Basqueira M, de Oliveira LC, Salles FC, Pereira NB, Sabino EC. An alternative storage method for characterization of the intestinal microbiota through next generation sequencing. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2018;60(e77):1–11.
 66. Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM, Turton JF, Ward ME, Brown S, et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2006 Apr;27(4):351–3.
 67. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009/09/21. 2009 Dec;53(12):5035–8.
 68. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol*. 2007 Feb;45(2):544–7.
 69. Krawczyk B, Samet A, Bronk M, Hellmann A, Kur J. Emerging linezolid-resistant, vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from a patient of a haematological unit in Poland. *Polish J Microbiol*. 2004;53(3):193–6.
 70. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clin Infect Dis*. 2004 Jul;39(1):55–60.
 71. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016 Feb;16(2):161–8.
 72. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15–22.
 73. Dropa M. Disseminação de resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientes de Enterobacteriaceae: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL. Universidade de São Paulo; 2012.
 74. Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Matté GR, Matté MH. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical Enterobacteriaceae from a hospital in Brazil. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(8):890–7.
 75. Marques C, Menezes J, Belas A, Aboim C, Cavaco-Silva P, Trigueiro G, et al. *Klebsiella pneumoniae* causing urinary tract infections in companion

- animals and humans: population structure, antimicrobial resistance and virulence genes. *J Antimicrob Chemother.* 2019 Mar;74(3):594–602.
76. Salazar-Ospina L, Vanegas JM, Jiménez JN. High intermittent colonization by diverse clones of β -lactam-resistant Gram-negative bacilli suggests an excessive antibiotic use and different sources of transmission in haemodialysis patients. *J Hosp Infect.* 2021;107:76–86.
77. Mc Innes P. Manual of Procedures - Human Microbiome Project. Core Microbiome Sampling Protocol A. *Natl Institutes Heal.* 2010;1–116.
78. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019;37(8):852–7.
79. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* [Internet]. 2016/05/23. 2016 Jul;13(7):581–3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27214047>
80. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J* [Internet]. 2017;11(12):2639–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
81. Evangelista HBA, Thomaz SM, Evangelista LR. Comparison of diversity indices applied to macrophyte incidence-based data. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2012;55(2):277–82.
82. Liu H, Ofstad A, Nicholas E. *Airtable*. San Francisco, CA; 2012. p. airtable.com.
83. Team RC. *R: A language and environment for statistical computing* [Internet]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2020. p. <https://www.R-project.org/>. Available from: <https://www.r-project.org/>
84. Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. *GenBank. Nucleic Acids Res* [Internet]. 2015/11/20. 2016 Jan 4;44(D1):D67–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26590407>
85. Carvalho R, Vaz A, Pereira FL, Dorella F, Aguiar E, Chatel JM, et al. Gut microbiome modulation during treatment of mucositis with the dairy bacterium *Lactococcus lactis* and recombinant strain secreting human antimicrobial PAP. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–10.
86. Kim SG, Becattini S, Moody TU, Shliha P V, Littmann ER, Seok R, et al. Microbiota-derived lantibiotic restores resistance against vancomycin-resistant *Enterococcus*. *Nature.* 2019;572(7771):665–669.
87. Zmora N, Zilberman-Schapira G, Suez J, Mor U, Dori-Bachash M, Bashardes S, et al. Personalized Gut Mucosal Colonization Resistance to Empiric Probiotics Is Associated with Unique Host and Microbiome Features. *Cell* [Internet]. 2018;174(6):1388-1405.e21. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.041>
88. Devaux CA, Million M, Raoult D. The Butyrogenic and Lactic Bacteria of the Gut Microbiota Determine the Outcome of Allogenic Hematopoietic Cell Transplant. *Front Microbiol.* 2020;11(July).
89. Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A. Proteobacteria: A Common Factor in Human Diseases. Canducci F, editor. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017;2017:9351507. Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/9351507>
90. Berg G, Rybakova D, Fischer D, Cernava T, Vergès MCC, Charles T, et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges.

- Microbiome. 2020;8(1):1–22.
91. Heidenreich D, Kreil S, Jawhar M, Müller N, Nolte F, Becker KP, et al. Course of colonization by multidrug-resistant organisms after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Hematol.* 2018;97(12):2501–8.
 92. D’Amico F, Soverini M, Zama D, Consolandi C, Severgnini M, Prete A, et al. Gut resistome plasticity in pediatric patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Sci Rep.* 2019;9(1):1–7.
 93. Yan L, Sun J, Xu X, Huang S. Epidemiology and risk factors of rectal colonization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae among high-risk patients from ICU and HSCT wards in a university hospital. *Antimicrob Resist Infect Control.* 2020;9(1):1–8.
 94. Wu G, Zhang C, Wang J, Zhang F, Wang R, Shen J, et al. Diminution of the gut resistome after a gut microbiota-targeted dietary intervention in obese children. *Sci Rep [Internet].* 2016;6:24030. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep24030>
 95. Sarmiento MRA, Paula TO de, Borges FM, Ferreira-Machado AB, Resende JA, Moreira APB, et al. Obesity, xenobiotic intake and antimicrobial-resistance genes in the human gastrointestinal tract: A comparative study of eutrophic, overweight and obese individuals. *Genes (Basel).* 2019;10(5).
 96. Tseng CH, Wu CY. The gut microbiome in obesity. *J Formos Med Assoc [Internet].* 2019;118:S3–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.07.009>

A publicações, cursos e apresentações aqui descritas não fizeram uso do valor técnico disponibilizado. Os certificados encontram-se no ANEXO F.

a. Capítulo de Livro

- 1- Moraes B, Arruda EAG, Costa SF. Microbiom. In: Lima JMC, Costa JIF, Santos AA. Gastroenterologia e Hepatologia: Sintomas, sinais, diagnóstico, tratamento. 2ªEd. Fortaleza: Edições UFC, 2019. ISBN: 978-85-7282-773-7
- 2- MORAES, BRUNA DEL GUERRA DE CARVALHO; Pereira, FMT . Espiritualidade como elemento de saúde no TCTH. In: Caio Henrique Vianna Baptista. (Org.). PSICOLOGIA E PSICO-ONCOLOGIA EM TRANSPLANTE DE MEDULA OSSEA. 1ed.Sao Paulo: Maker Midia, 2020, v. 1, p. 1-.
- 3- MORAES, BRUNA DEL GUERRA DE CARVALHO; GONZALEZ, B. ; NAKAMURA, C. H. ; HIROSE, E. Y. . Transplante de células-tronco hematopoiéticas. In: Ana Carolina Leão Silva; Erika Yuri Hirose; Simone Tamae Kikuchi. (Org.). MANUAL PRÁTICO DE ASSISTÊNCIA NUTRICIONAL AO PACIENTE ONCOLÓGICO ADULTO E PEDIÁTRICO - Grupo de estudos NutriOnco. 1ed.Rio de Janeiro: Atheneu, 2020, v. 1, p. 101-122.

b. Publicação em anais de congressos internacionais

- 4- Bruna G C Moraes, BSc Nutrition, Roberta C R Martins, MSc, PhD, Lucas A M Franco, MSc, PhD, Victor A C C Lima, MD, Gaspar C O Pereira, Bsc, Juliana T Santos, Nurse, BSc, Tamiris H Fernandes, Pharmaceutical, BSc, Thais Guimaraes, MD,MSc, PhD, Vanderson G Rocha, MD, Full Professor, Ester C Sabino, MD, Associate Professor, Silvia F Costa, MD,MSc, PhD, 2665. Intestinal Microbiome of Patients Submitted to Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Using *Lactobacillus plantarum* to Decolonized Multidrug-Resistant Bacteria, *Open Forum Infectious Diseases*, Volume 6, Issue Supplement_2, October 2019, Pages S933–S934, <https://doi.org/10.1093/ofid/ofz360.2343>- Fator de Impacto: 3.240.

- 5- Otuyama, Leonardo Jun, Moraes, Bruna Del Guerra de Carvalho, Mariano, Livia, Rocha, Vanderson. SWOT Analysis of a Tool for Data Management in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, Volume 26, Issue 3, S254 - S255.
- 6- Neto, A.D., Moraes, B.D., Rocha, I.M., Bezerra, F.A., Medeiros, G.O., Alves, L.B., Rossetti, R.M., Fayh, A., Mariano, L., & Rocha, V. (2018). Association of Sarcopenia with Toxicities and Survival after Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Adults with Lymphomas. *Blood*, 132, 2158-2158.

c. Artigo Submetido para publicação

- 7- Impact of exogenous *Lactobacillus plantarum* on the gut microbiome of hematopoietic stem cell transplantation patients colonized by multi-drug resistant bacteria – An exploratory study. Artigo submetido para o periódico *Clinical Infectious Disease*; Fator de Impacto: 8.313.

d. Artigo publicado como colaborador

- 8- Barban JB, Simões BP, Moraes BDGC, Anunciação CR, Rocha CS, Pintor DCQ, Guerra DC, et al. Consenso Brasileiro de Nutrição em Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas: Adultos. *einstein* (São Paulo). 2020;18:AE4530. https://doi.org/10.31744/einstein_journal/2020AE4530

e. Apresentação aulas em simpósios e congressos

1. Aplicação de probióticos em Oncologia. XVII Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica, 100% ONLINE, de 07 a 10 de abril de 2021. Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica.
2. Microbiota e a nutrição. V Curso Introdutório LADIISC: Desvendando a microbiota, realizado no dia 17 de março de 2021, evento online. Centro Universitário São Camilo, São Paulo, SP.
3. Atualizações nutricionais em microbioma e oncologia. 23/09/2020. 7º Congresso digital - Todos juntos contra o câncer (TJCC) online.
4. Como manter uma nutrição adequada durante a quimioterapia e o TMO: por que é importante? III Simpósio Internacional de Onco-Hematologia. 12 a 14 de março de 2020. Hotel Pullman São Paulo, SP.
5. Manipulando o microbioma – Probióticos. Curso Microbioma e Transplante de microbiota: onde estamos e para onde vamos. Instituto de Medicina Tropical (IMT/USP). 21/11/2019. São Paulo, SP.
6. Fatos e mitos no cuidado do paciente pós-transplantes: Alimentos. X Simpósio de Infecção em Imunodeprimidos do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 05/11/2019. São Paulo, SP.
7. Princípios de suporte nutricional. XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula óssea. 1/08/2019. Brasília, DF.
8. Microbiota: Evidências da influência no tratamento no câncer e perspectivas. X Congresso Internacional de Uro-oncologia, V Simpósio multiprofissional de uro-oncologia. 06/04/2019. Hotel Sheraton, São Paulo.

9. A prevenção de infecções como prevenção de multirresistentes: Alterando o microbioma para eliminar multirresistentes. I Simpósio “Multirresistência: Ideias e soluções do HC-FMUPS para um problema difícil”. 07/06/2018. Grupo de Controle de Infecção Hospitalar do HCFMUSP e Laboratório de Investigação Médica-54/USP.
10. *Lactobacillus plantarum* na colonização, na infecção por bactérias multirresistentes e no microbioma de pacientes submetidos a Transplante de células-tronco hematopoiéticas. II Workshop em Doenças Infecciosas e Parasitárias. 30/01/2017; 15/01/2018 e 14/01/2019. Instituto de Medicina Tropical (IMT/USP).

f. Apresentação de pôsteres em simpósios e congressos

1. Impacto de *Lactobacillus plantarum* exógeno no microbioma intestinal de pacientes submetidos ao transplante de células-tronco hematopoiéticas colonizados por bactérias multirresistentes a antimicrobianos. 12º Congresso Paulista de Infectologia. 1º COLOCADO na categoria ORAL. 30 de novembro a 04 de dezembro de 2020. Online.
2. Microbioma intestinal de pacientes submetidos a transplante de células troco hematopoiéticas utilizando *Lactobacillus plantarum* para descolonização de bactérias multirresistentes. Poster apresentado no XXI Congresso Brasileiro de Infectologia, setembro/2019. Belém, PA.
3. Descolonização espontânea em pacientes colonizados por bactérias multidroga resistentes previamente ao Transplante de Células-tronco hematopoiéticas. Poster apresentado no XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula óssea, agosto/2019. Brasília, DF.
4. Intestinal Microbiome of Patients Submitted to Hematopoietic Stem Cell Transplantation Using *Lactobacillus plantarum* to Decolonized Multidrug-Resistant Bacteria. IDWeek 2019, outubro/2019. Washington, DC.

g. Cursos extracurriculares realizados

- 1- Curso intermediário em pesquisa clínica. Período de 15 de abril a 30 de setembro de 2020, carga horária de 70 horas. Realizado pelo Hospital Oswaldo Cruz e subsidiado pelo PROADI SUS.

- 2- Curso de capacitação de Gerentes de dados em transplante de células-tronco hematopoiéticas. Período de agosto de 2019 a setembro de 2020. Realizado pela AMEO (Associação da Medula óssea do Estado de São Paulo) e subsidiado pelo PRONON (NUP: 25.000.001178/2017-55).

8.1 Anexo A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* na colonização, na infecção por bactérias multiresistentes e no microbioma de pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.

Pesquisador: sylvia figueiredo costa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 67319617.9.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.126.478

Apresentação do Projeto:

Impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* na colonização, na infecção por bactérias multiresistentes e no microbioma de pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.

Objetivo da Pesquisa:

Trata-se de estudo prospectivo, randomizado, controlado com objetivo de Avaliar o impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* na colonização e infecção por bactérias multiresistentes em pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa – Não há riscos com o consumo do placebo. Algumas pessoas podem apresentar gases ou desconforto estomacal após o uso do *Lactobacillus*.

O *Lactobacillus* tem risco de causar infecções em pacientes com inflamação da boca e ou intestino (mucosite ou doença do enxerto versus hospedeiro do intestino) durante o período de neutropenia (contagem baixa de um tipo de glóbulo branco responsável pela "defesa" do organismo) devido a

Endereço: Rua Ovídio Freire de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 06.400-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cep@cep@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 2.129.478

bactérias vivas que ultrapassam a barreira de defesa do trato gastrointestinal. Portanto, pacientes que apresentam mucosite (inflamação da boca e ou do intestino) e diarreia não receberão o Lactobacillus enquanto apresentarem sintomas, dor na boca, dor na barriga e diarreia, que aumentem o risco de infecção. Estas infecções podem ser graves, acometer apenas um órgão ou difundir pelo sangue. Contudo, raros casos de infecções ocasionadas por Lactobacillus já foram vistos. O Lactobacillus plantarum já foi consumido por crianças e adolescentes durante o transplante (TCTH) e não houve infecções ou qualquer outra complicação. Também não há qualquer relato deste probiótico causar complicações como infecções. Entretanto, caso alguma pessoa que participe do estudo seja identificada com infecção pelo Lactobacillus ofertado, o estudo será suspenso o paciente em questão terá todos os cuidados da equipe do transplante e da Infectologia do Hospital das Clínicas.

Benefícios:

O uso do Lactobacillus pode ser benéfico no transplante, o que será avaliado no estudo. Além da possível redução das infecções durante o transplante, há outros possíveis benefícios como a redução do período de diarreia, de dores na barriga e do risco de doença do enxerto versus hospedeiro (habitualmente chamada pela sigla DECH), complicação do transplante com doador (transplante alogênico) que pode ocorrer quando as células tronco do doador (células do transplante) reconhecem as células do paciente como estranhas e iniciam um ataque contra elas, afetando muitos tecidos do corpo como pulmão, pele e o próprio intestino.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nenhum.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Nenhuma.

Recomendações:

Sugerimos aprovação do estudo por não apresentar pendências éticas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sugerimos aprovação do estudo por não apresentar pendências éticas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)2661-7565 Fax: (11)2661-7565 E-mail: cepesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 2.126.478

pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PD_INFORMAÇÕES BÁSICAS DO LP	19/04/2017 15:55:52		Aceito
Outros	RENETO_845205.pdf	19/04/2017 15:55:56	silvia figuiredo costa	Aceito
	Cadastro_online.pdf	19/04/2017 15:55:59	silvia figuiredo costa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	19/04/2017 15:55:59	silvia figuiredo costa	Aceito
Outros	Parecer_Lactobacillus.pdf	23/03/2017 15:41:47	silvia figuiredo costa	Aceito
	carta_agencia.pdf	23/03/2017 15:37:27	silvia figuiredo costa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Avaliação	TCLE.docx	23/03/2017 14:50:06		
	projeto.docx	23/03/2017 14:57:14	silvia figuiredo costa	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

SÃO PAULO, 20 de Junho de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSÉ MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Cívico Pires de Campos, 885 SP - Brasil CEP: 05.408-010
 Bairro: Cerqueira César
 UF: SP Município: SÃO PAULO E-mail: cep@usp.br
 Telefone: (11)2001-7500 Fax: (11)2001-7505

8.2 Anexo B

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO-HCFMUSP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - **Impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* na colonização, na infecção por bactérias multirresistentes e no microbioma de pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.**

Pesquisador principal – Nutricionista Bruna Del Guerra de C. Moraes;
Orientador – Prof^a Dra. Silvia Figueiredo Costa – médica infectologista;
Departamento/Instituto – Departamento de Infectologia do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Convidamos o(a) Sr(a) para participar desta pesquisa cujo objetivo é verificar se o consumo do probiótico *Lactobacillus plantarum* auxilia na alteração das bactérias intestinais benéficas à saúde para reduzir riscos de infecção e colonização por bactérias comensais durante e após o Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas (TCTH).

Justificativa e objetivos do estudo – Durante o transplante (TCTH) há um aumento do risco de infecções por algumas bactérias. No nosso organismo há diversas bactérias que vivem pelas condições propícias que nosso organismo oferece, mas também trazem benefícios a nossa saúde. Um grande número delas se encontra no nosso intestino onde há diversas espécies e grupos (cepas). Essas bactérias tem sua quantidade e ação controlada por outras, como os *Lactobacillus*. O conjunto das bactérias do nosso intestino, suas interações com o nosso organismo, incluindo genéticas, é chamado de Microbioma. Essas bactérias intestinais são afetadas por diversas situações como a alimentação, o uso de antibióticos e de quimioterápicos. Tais alterações podem ser o aumento

em número de algumas bactérias, ou seja, uma colonização do organismo, que pode proporcionar alterações genéticas que as tornem resistentes a antibióticos e gerar infecções no hospedeiro.

Uma das formas de adequarmos a quantidade de bactérias intestinais é consumindo certas cepas (grupos) de bactérias que são bem estudadas, vivem em intestinos saudáveis e são benéficas por manter o equilíbrio da microbiota. Uma dessas cepas é o *Lactobacillus*, que denominamos de probiótico por passar pelo trato gastrointestinal e chegar vivo no intestino trazendo benefícios à saúde do consumidor. Os *Lactobacillus* já são usados na prática clínica em pacientes transplantados de medula óssea e com outras doenças que precisam melhorar a flora do intestino.

A melhora da flora intestinal com o consumo de probióticos está relacionada a melhora da imunidade, a inibição de bactérias indesejadas no intestino e o aumento da digestão de lactose.

Assim, o estudo irá verificar a quantidade e a variedade de bactérias no intestino pré-transplante e após a ingestão de *Lactobacillus*, bem como avaliar se o consumo de *Lactobacillus* poderá controlar e prevenir infecções pela alteração das bactérias intestinais.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados – A análise de colonização pré transplante será feita partir da coleta de material por uma haste longa com um algodão na extremidade, material chamado de SWAB, das regiões inguinal e retal. Para a análise do microbioma, será coletada uma amostra de fezes em frasco específico contendo solução de guanidina para preservar o DNA das bactérias do intestino. Após a coleta, o frasco deve ser congelado e entregue para o pesquisador principal deste estudo.

Após a primeira coleta de fezes, será ofertado o probiótico por um período de um mês. Durante esse período, será necessário coletar amostras de fezes semanalmente (uma vez na semana). A amostra de fezes deverá ser coletada em frasco específico entregue pela pesquisadora desse estudo. A amostra deve ser coletada tomando-se cautela para não desprezar o conteúdo (solução de guanidina). Logo após a coleta, o frasco deve ser congelado e no dia da entrega para o pesquisador principal, acondicionar em bolsa térmica para manter a temperatura. Caso o Sr(a) apresente alguma infecção ou colonização por

bactéria resistente a antibióticos uma nova amostra por swab retal será coletada para realização de uma análise em laboratório (análise chamada de PCR ou reação em cadeia da polimerase) para avaliar os genes da bactéria responsável pela infecção.

Haverá uma consulta detalhada com a nutricionista pesquisadora para coletar dados de hábitos alimentares e intestinais logo que aceitar participar do estudo. Após essa consulta inicial com a nutricionista e tendo aceitado participar do estudo, o Sr.(a) será encaminhado para a farmácia do transplante para retirar o *Lactobacillus*.

Possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa

– Não há riscos com o consumo do placebo. Algumas pessoas podem apresentar gases ou desconforto estomacal após o uso do *Lactobacillus*.

O *Lactobacillus* tem risco de causar infecções em pacientes com inflamação da boca e ou intestino (mucosite ou doença do enxerto versus hospedeiro do intestino) durante o período de neutropenia (contagem baixa de um tipo de glóbulo branco responsável pela “defesa” do organismo) devido a bactérias vivas que ultrapassam a barreira de defesa do trato gastrointestinal. Portanto, pacientes que apresentam mucosite (inflamação da boca e ou do intestino) e diarreia não receberão o *Lactobacillus* enquanto apresentarem sintomas, dor na boca, dor na barriga e diarreia, que aumentem o risco de infecção. Estas infecções podem ser graves, acometer apenas um órgão ou difundir pelo sangue. Contudo, raros casos de infecções ocasionadas por *Lactobacillus* já foram vistos.

O *Lactobacillus plantarum* já foi consumido por crianças e adolescentes durante o transplante (TCTH) e não houve infecções ou qualquer outra complicação. Também não há qualquer relato deste probiótico causar complicações como infecções. Entretanto, caso alguma pessoa que participe do estudo seja identificada com infecção pelo *Lactobacillus* ofertado, o estudo será suspenso o paciente em questão terá todos os cuidados da equipe do transplante e da infectologia do Hospital das Clínicas.

O uso do *Lactobacillus* pode ser benéfico no transplante, o que será avaliado no estudo. Além da possível redução das infecções durante o transplante, há outros possíveis benefícios como a redução do período de diarreia, de dores na barriga e do risco de doença do enxerto versus hospedeiro (habitualmente chamada pela

sigla DECH), complicação do transplante com doador (transplante alogênico) que pode ocorrer quando as células tronco do doador (células do transplante) reconhecem as células do paciente como estranhas e iniciam um ataque contra elas, afetando muitos tecidos do corpo como pulmão, pele e o próprio intestino.

Benefícios esperados para o participante – Diversos estudos científicos tem demonstrado que o transplante promove a alteração da microbiota e a correlaciona com o desenvolvimento da doença de enxerto versus hospedeiro, mas o que mais pretendemos é controlar e reduzir o risco de infecções no transplante.

Caso não seja observado benefício no consumo do *Lactobacillus* durante o transplante, sua participação terá sido de grande valia para a comunidade científica, contribuindo nos estudo de probióticos, de infecções no transplante de células tronco hematopoiéticas e de microbioma.

Durante todo o estudo o Sr(a) será acompanhado por equipe multiprofissional especializada em transplante. O acompanhamento integrado será proporcionado ao Sr(a) para prevenir riscos ou reduzir efeitos adversos da pesquisa em questão.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa – Durante o transplante a assistência será feita pela equipe multiprofissional do transplante. Nos casos de dúvidas ou necessidade de esclarecimento de algum ponto sobre o uso do *Lactobacillus* a nutricionista/pesquisadora pode ser acionada pela equipe ou o Sr(a) poderá entrar em contato por e-mail.

O Sr(a) tem total liberdade em se recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalização alguma, de sigilo e privacidade.

O Sr(a) receberá uma via do termo de consentimento. Não haverá despesas pela parte do Sr(a). As despesas decorrentes desse estudo serão financiadas pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

O material biológico (SWAB retal e inguinal e amostras de fezes) obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011 que diz respeito ao armazenamento e à utilização de material biológico humano com finalidade de pesquisa.

As amostras não serão reutilizadas, apenas servirão para análises dos dados obtidos para este estudo. Caso estas análises sejam utilizadas para nova pesquisa, será pedido novo consentimento. Toda nova pesquisa só será realizada com a aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CEPCONEP).

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Nutricionista Bruna Moraes que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 - Cerqueira César, São Paulo - SP, 05403-000.

Telefone(s) (11)2661 7173 ou (11) 940813284

e-mail bruna.carvalho@hc.fm.usp.br

ou brudelguerra@yahoo.com.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “**Impacto do uso de *Lactobacillus plantarum* na colonização, na infecção por bactérias multirresistentes e no microbioma de pacientes submetidos a Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas**”.

Eu discuti as informações acima com a Pesquisadora Responsável Bruna Del Guerra de Carvalho Moraes sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo um via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do participante /representante legal.

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do responsável pelo estudo: Nutricionista Bruna Moraes

CRN3 26136

Data ____ / ____ / ____

**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO
DO PARTICIPANTE DA
PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**



1. NOME: :.....

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :

SEXO: M F DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:.....BAIRRO:.....CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE: (.....).....

2. RESPONSÁVEL LEGAL.....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE

SEXO: M F DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº

APTO:.....BAIRRO:.....CIDADE.....

CEP:..... TELEFONE: (.....).....

8.3 Anexo C

Critérios do Centers for Disease Control and Prevention (CDC) para infecção hospitalar.

Definições dos principais sítios de infecção hospitalar

Infecção de corrente sanguínea (ICS)

Para diagnóstico da infecção de corrente sanguínea confirmada laboratorialmente, o paciente deve preencher um dos seguintes critérios:

1. Paciente de qualquer idade, com no mínimo uma hemocultura positiva coletada de sangue periférico, com patógeno não relacionado à infecção em outro sítio.

2. Paciente de qualquer idade com pelo menos um dos seguintes sinais e sintomas não relacionados à infecção em outro sítio: febre, tremores, hipotensão.

E

Duas ou mais hemoculturas (em diferentes punções e com intervalo máximo de 48h) com contaminante de pele comum (ex: estafilococo coagulase negativo, difteróides, etc)

3. Paciente menor que 1 ano de idade, com os seguintes sintomas não relacionados com outro foco: febre, hipotermia, instabilidade hemodinâmica, apnéia, bradicardia, intolerância alimentar e hipoatividade.

E

Duas ou mais hemoculturas (em diferentes punções e com intervalo máximo de 48h) com contaminante comum de pele

Para uma infecção de corrente sanguínea ser relacionada a cateter venoso central, esta deve ser diagnosticada em até 48h após a retirada do cateter. Porém, não existe período mínimo após a inserção do dispositivo para que este seja relacionado à infecção.

Infecção do trato gastrointestinal

Para definição, optou-se por dividi-las entre as gastroenterites e as outras infecções do TGI (esofagites, enterocolites e retites)

Para diagnóstico das gastroenterites, é necessário que o paciente preencha pelo menos um dos critérios abaixo:

1. Paciente com quadro de diarreia aguda (fezes líquidas por mais de 12 horas), acompanhada ou não de vômitos, febre, sem outra causa infecciosa possível.

2. Paciente com no mínimo dois dos seguintes sinais e sintomas: náuseas e vômitos, dor abdominal, febre e cefaleia.

Associado no mínimo outro critério laboratorial:

- a. Um patógeno entérico isolado em cultura de fezes ou swab retal.
- b. Antígenos ou anticorpos entéricos identificados em amostras de sangue
- c. Um patógeno entérico identificado através de mudanças citopáticas em culturas de células.
- d. Identificação de IgM ou aumento dos títulos de IgG de um determinado patógeno entérico.

Outras infecções entéricas excluindo-se as gastroenterites e as apendicites são definidas a partir da presença de um dos seguintes critérios:

1. Abscesso ou sinais de infecção visualizados ou durante ato cirúrgico, ou em exame anatomopatológico
2. Paciente com no mínimo dois dos seguintes sinais e sintomas: febre, náuseas, vômitos ou dor abdominal, seguido de ao menos um dos critérios seguintes:
 - a. Micro-organismo isolado de cultura de material drenado, ou obtido durante procedimento cirúrgico ou endoscópico.
 - b. Micro-organismo visualizado em exame bacterioscópico (Gram) nas situações descritas acima
 - c. Micro-organismo isolado em hemocultura
 - d. Achados radiológicos compatíveis com quadro infeccioso
 - e. Achados patológicos em exame endoscópico (ex: esofagite ou proctite por cândida)

Pneumonia

O diagnóstico de pneumonia em adultos, em geral é de difícil definição, pois se baseia no quadro clínico e radiológico do paciente.

Depende da existência em pelo menos dois exames, achados radiológicos compatíveis com consolidação, cavitação ou mesmo infiltrado difuso persistente.

Além disso, faz-se necessário que o paciente tenha quadro clínico compatível, com febre, leucopenia (<4.000 leuco/mm³) ou leucocitose (>12.000 leuco/mm³) associado à presença de sintomas respiratórios como tosse produtiva, secreção purulenta, dispneia, ou piora desses aspectos no paciente pneumopata crônico. Pode ocorrer também piora nos parâmetros de troca gasosa ou aumento da necessidade de suporte de O₂.

Microbiologicamente deve existir ao menos um dos critérios citados abaixo para que se defina uma infecção pulmonar causada por patógenos bacterianos habituais:

1. Hemocultura positiva (sem outro foco definido)
2. Cultura de líquido pleural positiva
3. Cultura quantitativa positiva de lavado bronco alveolar (LBA) ou escovado bronco alveolar
4. $\geq 5\%$ das células obtidas por LBA – com bactérias intracelulares no exame microscópico direto
5. Exame histopatológico mostra pelo menos uma das seguintes evidências de pneumonia: formação de abscesso ou foco de consolidação com acúmulo intenso de polimorfonucleares (PMN) em bronquíolos e alvéolos ou evidência de invasão do parênquima pulmonar por hifas ou pseudo-hifas

A infecção do trato urinário

A infecção do trato urinário (ITU) pode ser sintomática ou assintomática, sendo que a primeira deve preencher ao menos um dos seguintes critérios:

1. Paciente com ou sem sonda vesical no momento da coleta da urocultura

E

Ao menos um dos seguintes sinais ou sintomas sem outra causa reconhecida: febre ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$), desconforto supra púbico, disúria, polaciúria, dor ou desconforto no ângulo costo-vertebral

E

Urocultura com ≥ 105 UFC/ml com no máximo duas espécies de micro-organismos.

2 .Paciente com ou sem sonda vesical no momento da coleta da urocultura

E

Ao menos dois dos sinais ou sintomas citados acima

E

Análise de urina com pelo menos um dos seguintes achados: teste em urina positivo para esterase leucocitária e/ou nitrato, leucocitúria (≥ 10 leucócitos/campo ou > 10.000 leucócitos/ml) ou bacterioscopia positiva

E

Ao menos 2 culturas positivas com o mesmo micro-organismo isolado, crescimento $\geq 10^3$ e $< 10^5$ UFC/ml com no máximo duas espécies de micro-organismos em cada amostra, ou

Crescimento de 10^5 UFC/ml de um único patógeno (Gram-negativo ou *S.saprophyticus*) em paciente em vigência de antibioticoterapia que cubra patógenos de trato urinário.

ou

Diagnóstico médico de infecção do trato urinário

Para o diagnóstico da bacteriúria assintomática, é necessário que ocorra ao menos um dos critérios abaixo:

1. Paciente com sondagem vesical por pelo menos 7 dias no momento da urocultura, com crescimento de $> 10^5$ UFC/ml de no máximo duas espécies de micro-organismos por amostra.

E

Paciente afebril e sem sintomas relacionados à infecção urinária

2. Paciente sem sondagem vesical por pelo menos 7 dias no momento da urocultura, com crescimento do mesmo patógeno em no mínimo duas amostras diferentes, com $> 10^5$ UFC/ml de no máximo duas espécies de micro-organismos por amostra

E

Paciente afebril sem sintomas relaciona

ICS associada ao dano de barreira mucosa (ICSADBM)

Paciente de qualquer idade que atende aos critérios de ICS laboratorialmente confirmada com pelo menos 1 amostra de hemocultura com qualquer dos seguintes organismos intestinais: *Bacteroides spp.*, *Candida spp.*, *Clostridium spp.*, *Enterococcus spp.*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Prevotella spp.*, *Veillonella spp.* ou *Enterobacteriaceae*, e nenhum outro organismo.

E

Paciente preenche pelo menos 1 dos seguintes critérios:

1. Paciente transplantado alogênico de medula óssea dentro de um ano com um dos seguintes aspectos documentados durante a mesma internação da hemocultura positiva:

a. Doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) gastrointestinal grau III ou IV.

b. ≥ 1 litro de diarreia em 24 horas (ou ≥ 1 mL/kg em 24 horas para pacientes menores que 18 anos de idade) com início em ou dentro de 7 dias de calendário antes da data da hemocultura positiva.

2. É neutropênico, definido com pelo menos dois dias separados com valores de contagem absoluta de neutrófilos ou contagem de células brancas no sangue total menor que 500 células/mm³ dentro de um período de 7 dias que inclui a data da hemocultura positiva (Dia 1), e investigar 03 dias antes e três dias depois.

OU

Paciente de qualquer idade, com ICS confirmada com pelo menos 1 amostra de hemocultura com *Streptococcus* do grupo *viridans* e nenhum outro organismo, com sintoma de febre ($>38^{\circ}\text{C}$), calafrios ou hipotensão.

E Paciente preenche pelo menos 1 dos seguintes critérios:

1. Paciente transplantado alogênico de medula óssea dentro de um ano com um dos seguintes aspectos documentados durante a mesma internação da hemocultura positiva:

a. Doença do enxerto contra hospedeiro (DECH) gastrointestinal grau III ou IV.

b. ≥ 1 litro de diarreia em 24 horas (ou ≥ 20 mL/kg em 24 horas para pacientes menores que 18 anos de idade) com início em ou dentro de 7 dias de calendário antes da data da hemocultura positiva.

2. É neutropênico, definido com pelo menos dois dias separados com valores de contagem absoluta de neutrófilos ou contagem de células brancas no sangue total menor que 500 células/mm³ dentro de um período de 7 dias que inclui a data da hemocultura positiva (Dia 1), e investigar 03 dias antes e três dias depois.

8.4 Anexo D

8.5 Avaliação Subjetiva Global Produzida Pelo Paciente

2. Peso

Resumo do meu peso atual e recente:
 Eu atualmente peso aproximadamente _____ kg
 Eu tenho aproximadamente 1 metro e _____ cm
 Há um mês atrás eu pesava aproximadamente _____ kg
 Há seis meses atrás eu pesava aproximadamente _____ kg
 Durante as 2 últimas semanas meu peso:
 Diminuiu Ficou igual Aumentou

4. Ingestão alimentar

Em comparação a minha alimentação normal, eu poderia considerar minha ingestão alimentar durante o último mês como:

Sem mudanças
 Mais que o normal
 Menos que o normal
 Atualmente, eu estou comendo:
 Comida normal (alimentos sólidos) em menor quantidade
 Comida normal (alimentos sólidos) em pouca quantidade
 Apenas líquidos
 Apenas suplementos nutricionais
 Muito pouco de qualquer comida
 Apenas alimentos por sonda ou pela veia

1. Sintomas

Durante as 2 últimas semanas, eu tenho tido os seguintes problemas que me impedem de comer o suficiente (marque todos os que estiver sentindo):

Sem problemas para se alimentar
 Sem apetite, apenas sem vontade de comer
 Náusea (vontade de vomitar)
 Vômito
 Constipação
 Diarreia
 Feridas na boca
 Boca seca
 Alimentos têm gosto estranho ou não têm gosto
 Os cheiros me enjoam
 Problemas para engolir
 Rapidamente me sinto satisfeito
 Dor, onde? _____
 Outros* _____

*ex. depressão, problemas dentários, financeiros

3. Atividades e função

No último mês, eu consideraria minha atividade como:

Normal, sem nenhuma limitação
 Não totalmente normal, mas capaz de manter quase todas as atividades normais
 Não me sentindo bem para a maioria das coisas, mas ficando na cama ou na cadeira menos da metade do dia
 Capaz de fazer pouca atividade, e passando a maior parte do tempo na cadeira ou na cama
 Bastante tempo acamado, raramente fora da cama

O restante do questionário será preenchido pelo nutricionista. Obrigada.

5. Doença e sua relação com requerimentos nutricionais

Todos os diagnósticos relevantes _____

Estadiamento da doença primária I II III IV Outro _____

Idade _____

6. Demanda Metabólica

7. Exame físico

Score total ASG-PPP: A + B + C + D =

Score numérico do anexo 2 B
 Score numérico do anexo 3 C
 Score numérico do anexo 4 D

8.6 Anexo E

Escala Fecal de Bristol

Tipo 01		Pedacos separados, duros como amendoim
Tipo 02		Forma de salsicha, mas segmentada
Tipo 03		Forma de salsicha, mas com fendas na superficie
Tipo 04		Forma de salsicha ou cobra, lisa e mole
Tipo 05		Pedacos moles, mas contornos nitidos
Tipo 06		Pedacos aerados, contornos esgarçados
Tipo 07		Aquosa, sem peças sólidas

8.7 Anexo F

30.11 a 04.12.20
EVENTO VIRTUAL

12^o Congresso Paulista de Infectologia

Certificado

Certificamos que o trabalho **OR-23 - IMPACTO DE LACTOBACILLUS PLANTARUM EXÓGENO NO MICROBIOMA INTESTINAL DE PACIENTES SUBMETIDOS AO TRANSPLANTE DE CÉLULAS-TRONCO HEMATOPOÉTICAS COLONIZADOS POR BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES A ANTIMICROBIANOS** participou do **12^o Congresso Paulista de Infectologia**, realizado virtualmente de 30 de novembro a 04 de dezembro de 2020, na qualidade de **Melhor Trabalho Apresentação Oral – 1^o COLOCADO**.

Autores: BRUNA DGC MORAES; ROBERTA C RUEDAS MARTINS; LUCAS A. MOYSES FRANCO; GASPAR C OLIVEIRA PEREIRA; MARINA FARREL CÔRTEZ; STEVEN S WITKIN; LIVIA CAROLINE MARIANO; VANDERSON G ROCHA; ESTER SABINO; SILVIA FIGUEIREDO COSTA

04 de dezembro de 2020.

Eduardo Alexandrino Servolo de Medeiros
EDUARDO ALEXANDRINO SERVOLO DE MEDEIROS
Presidente da SPI

Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza
CARLOS MAGNO CASTELO BRANCO FORTALEZA
Presidente da Comissão Científica

Esper Georges Kallás
ESPER GEORGES KALLÁS
Coordenador Científico da SPI

realização
SOCIETATE PAULISTA DE INFECTOLOGIA

XXIII CONGRESSO SBTMO 2019
SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

CERTIFICADO

Certificamos que Bruna Del Giúerra de Carvalho Moraes, Jessica Ferraz de Ramos, Priscila Tavares Mesquita, Livia Caroline Barbosa Mariano, Marina de Mattos Nascimento, Thais Guérrea, Vanderson Rocha, Silvia Figueiredo Costa,

Participaram do XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, realizado no período de 1 a 3 de agosto de 2019, na cidade de Brasília, como autores do pôster: P 96 - Despolonização espontânea em pacientes colonizados por bactérias multidroga resistentes previamente ao Transplante de Células Tronco Hematopoiéticas.

Brasília-DF, 01 de agosto de 2019.

Dr. Nelson Henriques
Presidente da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea

Dr. Gustavo Estanillo
Presidente do XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea - SBTMO 2019

Dr. Vanderson Rocha
Presidente da Comissão Científica do XXIII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea - SBTMO 2019

XXIII CONGRESSO SBTMO 2019

SBTMO

ASTCT

