

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DESPORTOS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA

Contagem, identificação e suscetibilidade de microrganismos isolados da saliva de adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana antes e após o bochecho com anti-sépticos.

Cristyane Gonçalves Benicio Bastos Rocha

Goiânia-GO, 2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Cristyane Gonçalves Benicio Bastos Rocha

Contagem, identificação e suscetibilidade de microrganismos isolados da saliva de adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana antes e após o bochecho com anti-sépticos.

Orientador:

Prof^o.Dr^o. Cleomenes Reis

Co-orientador:

Prof^a.Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta

Dissertação submetida ao PPGMT/IPTSP/UFG
como requisito parcial para obtenção do
Grau de Mestre na área de concentração de
Microbiologia

Goiânia-GO, 2005

Dedico este trabalho aos portadores do HIV/AIDS que pelo exemplo de resignação e luta pela vida reforçaram em mim o sentimento de solidariedade.

Agradecimentos

A Deus que com sua bondade infinita concedeu-me a vida.

Ao meu esposo Zander Bastos Rocha, companheiro, incentivador. Obrigada pelo seu exemplo de esforço e dedicação. Obrigada pela nossa sementinha de amor (Júlia)!

Aos meus pais Sonia Beatriz Benicio e Ney Gonçalves Benicio pelo amor e apoio incondicionais. Mãe, obrigada pelo exemplo de desprendimento, renúncia e resignação. Pai, me espelho na sua força e integridade!

Aos meus irmãos, sobrinhos Anna Clara e Geovanni, cunhados, cunhada Cristiane, sogro, sogra e demais familiares, pela alegria e bênção de tê-los ao meu lado e...”*por mais que nossos assentos não estejam lado a lado, com certeza, o vagão é o mesmo*”.

Ao Prof^o. Dr^o. Cleomenes Reis, meu orientador, exemplo de sabedoria, dedicação e espírito científico. Obrigada pela confiança, apoio e sábios conselhos. Minha profunda admiração e respeito.

À Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta, minha co-orientadora e amiga de todas as horas. Desde 1994, a minha bagagem vem crescendo e se tornado valiosa principalmente em função da nossa história! Você despertou em mim a paixão pela Microbiologia Bucal. Ausentei por três anos e, quando me encontrei profundamente, voltei e você me recebeu com um abraço... não o da nossa despedida em Águas de São Pedro, mas o mesmo das nossas festas assistenciais na Creche Santa Úrsula, lembra? Fui a sua primeira estagiária no IPTSP e continuarei sendo a “sua menina”. Sabe por que você é muito especial para mim? Pela profundidade ímpar com que me atinge os sentimentos.

Aos meus colegas de Laboratório de Bacteriologia Médica (Lara Stefânia Netto de O. Leão, Mirian Rodrigues Borges, Alessandra Marques Cardoso, Patrícia Staciarini Anders, Renata Silva Pereira, Ana Cláudia Camargo Campos, Thaís Teixeira Fernandes, Daniella Vilela de Lima, Frederico Mendes, Daiana Villas Boas Silva) meu profundo agradecimento pela amizade, carinho e colaboração com este trabalho.

À Juliana Lamaro Cardoso (Xuxu) - um grande reencontro de almas afins! Compartilhamos risos, lágrimas... Obrigada, Xu, por cuidar de mim!

À Carla Atavila da Silva Vieira (Carlinha)- doce amiga com luz peculiar que contagia! Deus nos apresentou porque temos histórias parecidas...Com sua amizade me completo!

À Aysha Jussara Ivonilde Carrim (Ju) - amiga para sempre! Obrigada por fazer parte da minha história!

Aos técnicos e funcionários do IPTSP, representados pela Lêda Maria A. Valadão e à Sr^a Mailde Francisca pela ajuda e carinho.

Ao Laboratório de Micologia em nome da professora Maria do Rosário Rodrigues Silva e da mestranda Karla Carvalho Miranda, pelo muito que colaboraram na parte prática do meu trabalho.

Agradeço também a Dr^a Cleone Pereira Campos, cirurgiã-dentista do Hospital de Doenças Tropicais e Iraná Canuto dos Santos, técnica em higiene dentária, pela colaboração e desprendimento imprescindíveis na realização das coletas deste trabalho. Vocês são muito especiais! A cada coleta éramos três compartilhando da mesma atmosfera de respeito e carinho aos pacientes com aids.

Ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, na pessoa da coordenadora Prof^a Dr^a Regina Maria Bringel Martins e demais professores.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A cada paciente que permitiu a coleta do material para que eu concretizasse este trabalho. Quando você se aproximou de mim, o olhar estava profundo e perdido... tinha o olhar em fuga, medo de ser maltratado, discriminado... talvez a minha ajuda tenha sido pequena, mas ter contribuído para a melhoria da sua saúde bucal representou para mim magnífica lição de amor e fraternidade.

“Não sei... se a vida é curta
Ou longa demais pra nós
Mas sei que nada do que vivemos
tem sentido, se não tocamos o coração das
pessoas.

Muitas vezes basta ser:

Colo que acolhe,
Braço que envolve,
Palavra que conforta,
Silêncio que respeita,
Alegria que contagia,
Lágrima que corre,
Olhar que acaricia,
Desejo que sacia,
Amor que promove.

E isso não é coisa do outro mundo,
é o que dá sentido à vida.
é o que faz com que ela
não seja nem curta, nem longa
demais,

Mas que seja intensa, verdadeira, pura...
enquanto durar”

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

Cora Coralina

SUMÁRIO

Conteúdo	Página
1. Introdução	1
2. Objetivos	8
3. Material e Método	9
3.1 Seleção dos pacientes	9
3.2 Isolamento dos estreptococos do grupo mutans	9
3.3 Isolamento de estafilococos	10
3.4 Isolamento de bastonetes Gram negativos fermentadores	12
3.5 Isolamento de bastonetes Gram negativos não fermentadores	12
3.6 Isolamento de leveduras	13
3.7 Determinação <i>in vitro</i> da suscetibilidade dos estreptococos do grupo mutans, estafilococos, bastonetes Gram negativos e leveduras a dois anti-sépticos bucais	13
3.8 Determinação <i>in vitro</i> da suscetibilidade dos estafilococos e enterobactérias a três antimicrobianos	14
4. Resultados	15
Referências Bibliográficas	16
4.1 Artigos Científicos	
4.1.1 Contagem e identificação de microrganismos da saliva de portadores do vírus da imunodeficiência humana antes e após o bochecho com anti-sépticos	20
4.1.2 Efeito do uso de anti-sépticos na redução de leveduras na saliva de adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana	39
4.1.3 Emergência de estafilococos e bastonetes Gram negativos resistentes a antimicrobianos isolados da saliva de adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana	52

5. Considerações finais	66
6. Anexos	
A -Comitê de Ética	68
B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	69
C- Ficha de Anamnese	71
D- Normas para publicação da Revista de Patologia Tropical	72
E - Normas para publicação da revista Panamericana de Salud Pública	74

Lista de Tabelas

Conteúdo	Página
Artigo 4.1.1	
Tabela 1: Média da contagem microbiana (ufc/mL) na saliva de portadores do HIV antes e após o uso de Periogard® e Cepacol®	37
Tabela 2: Variação da concentração inibitória mínima (CIM) dos microrganismos isolados da saliva de 56 portadores do HIV frente ao Periogard® e Cepacol®	37
Artigo 4.1.2	
Tabela 1: Distribuição de 54 leveduras na saliva de portadores do HIV antes e após o bochecho com Periogard® e Cepacol®	50
Tabela 2: Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de isolados de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas da saliva de portadores de HIV frente ao Periogard® usando a técnica de diluição em ágar	50
Tabela 3: Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de isolados de leveduras do gênero <i>Candida</i> obtidas da saliva de portadores de HIV frente ao Cepacol®	51
Artigo 4.1.3	
Tabela 1: Isolamento de estafilococos e bastonetes Gram negativos da saliva de adultos portadores do HIV antes e após bochecho com anti-sépticos	64
Tabela 2: Perfil de suscetibilidade (CIM) das cepas de estafilococos e bastonetes Gram negativos isolados da saliva de adultos portadores do HIV	64
Tabela 3: Perfil de suscetibilidade (CIM) das cepas de estafilococos e bastonetes Gram negativos isolados da saliva de adultos portadores do HIV frente a Antimicrobianos	65

Apresentação

No início da década de 80, a eclosão de uma nova doença que posteriormente, foi identificada como uma síndrome, conhecida mundialmente pela sigla AIDS/SIDA (*Acquired Immunodeficiency Syndrome* / Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) foi responsável por mudanças significativas em outros campos que não somente a saúde, principalmente por combinar comportamento sexual e doença. O desafio de combater a doença se instalou em diferentes áreas do conhecimento além das ciências biomédicas, tais como: economia, antropologia, política, direitos humanos, dentre outras.

A aids foi identificada pela primeira vez no Brasil em 1980. Inicialmente restrita às nossas grandes metrópoles, como Rio de Janeiro e São Paulo, iniciou a sua expansão para outras capitais e o para interior do País a partir da segunda metade dessa mesma década.

Em 2000, cerca de 60% dos municípios brasileiros registravam pelo menos um caso da doença.

O panorama geográfico atual da aids no Brasil é bastante heterogêneo, com coeficientes de incidência expressando ampla magnitude de variação, ao longo do seu território. Hoje, o que denominamos de "epidemia de aids" no Brasil é, de fato, o somatório de subepidemias microrregionais em interação permanente, devido aos movimentos migratórios, aos fluxos comerciais e de transportes, aos deslocamentos de mão-de-obra, ao turismo, ou seja, de maneira mais geral, à mobilidade da população. Sendo assim, a aids não está distribuída entre a população de maneira uniforme, o que coloca diante dos técnicos a necessidade de identificar os indivíduos mais expostos ao risco da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, assim como de outras doenças sexualmente transmissíveis, as chamadas Doenças Sexualmente Transmissíveis (DST), para um melhor direcionamento das ações de prevenção e controle.

Nesse contexto, se destacam os grupos de apoio e/ou discussão, atividades de orientação promovidas pelas numerosas ONGs (Organizações Não Governamentais) que atuam na área. Meu interesse pelos doentes de aids surgiu a partir do meu primeiro emprego: atendimento odontológico aos portadores do HIV no Condomínio Solidariedade, instituição administrada pela OVG (Organização das Voluntárias de Goiás).

Em termos técnicos, para a odontologia, o soropositivo é atendido com os mesmos procedimentos que qualquer outro paciente, seguindo todos os protocolos de biossegurança. Estar preparado para o atendimento de qualquer indivíduo depende, principalmente do relacionamento entre cirurgião-dentista e o paciente, relacionamento este que deve ser pautado pelo respeito, pela moralidade e pela confiança. Durante esse período, fiz especialização em Saúde Pública com o objetivo de promover saúde, proporcionando ao paciente e por consequência à comunidade meios necessários como conhecimento e atitudes, visando melhorar sua saúde, exercendo um maior controle sobre ela.

Na microbiologia encontrei as ferramentas necessárias para melhor compreender e obter uma concepção ampla de saúde ao incorporar aos determinantes sociais, econômicos e ambientais da saúde pública os aspectos biológicos e mais precisamente microbiológicos com interferência no processo saúde-doença.

Caracterizar a microbiota bucal de portadores do HIV, contribuindo para o restabelecimento e manutenção da saúde bucal pela avaliação de substâncias antimicrobianas quanto à habilidade de controlar microrganismos bucais foi o propósito deste estudo.

Inicialmente, apresentaremos na introdução um breve resumo do boletim epidemiológico da aids Brasil e no mundo, bem como da patogenia do vírus da imunodeficiência humana e das pesquisas realizadas na área de microbiologia bucal em portador do HIV para, em seqüência, detalharmos os objetivos deste trabalho. Posteriormente, apresentaremos o material e métodos de forma geral empregado no estudo e encerraremos com as referências bibliográficas consultadas.

A parte experimental da dissertação se encontra na forma de três artigos redigidos em português por seguirem normas das revistas nacionais. Um artigo será submetido à apreciação pelos revisores da revista de Patologia Tropical e os outros dois para o corpo editorial da revista Panamericana de Salud Publica.

Por fim, faremos as últimas considerações, afirmando da necessidade de cada vez mais intervir com conhecimento frente às condições bucais desses pacientes, bem como empregar substâncias que estão ao nosso alcance como os anti-sépticos, para melhorar as condições de saúde e vida desses pacientes, lembrando que “a saúde começa pela boca”.

Resumo

A boca alberga uma grande variedade de microrganismos, e a coexistência dessa microbiota com a saúde bucal decorre das condições imunológicas e de processos de adaptação e readaptação contínuos entre o hospedeiro e os microrganismos. Com a imunossupressão causada pelo HIV, o equilíbrio da microbiota bucal pode ser alterado e infecções oportunistas podem ocorrer. Em vista disso, objetivou-se isolar, identificar e determinar a suscetibilidade de microrganismos isolados da saliva de adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana. Foram coletadas, em tubos esterilizados, duas amostras de saliva não estimulada (2,0mL) de cada paciente. A primeira coleta de saliva foi realizada antes de qualquer intervenção do profissional. A segunda foi realizada após instruções de higiene bucal, realização de escovação supervisionada, uso de fio dental e bochecho por um minuto com Periogard® ou Cepacol®. A saliva foi diluída e gotejada em ágar SB20 para isolamento de estreptococos do grupo mutans (EGM), em ágar manitol para estafilococos, em ágar MacConkey para bastonetes Gram negativos (BGN) e em ágar Sabouraud para isolamento de leveduras. Após períodos de incubação específicos, as colônias características foram contadas e submetidas à identificação bioquímica e testes de suscetibilidade (Periogard®, Cepacol®, amoxicilina, azitromicina e sulfametoxazol-trimetoprim). Foram isolados 168 microrganismos da saliva de 56 pacientes, sendo 54 leveduras (42 *Candida albicans*; 10 *C. parapsilosis* e 2 *C. glabrata*); 42 bastonetes Gram negativos (34 *Enterobacter cloacae* e 9 *Pseudomonas aeruginosa*); 42 estafilococos (34 *Staphylococcus aureus*; 8 Estafilococos coagulase negativos); 29 Estreptococos do grupo mutans (21 *Streptococcus mutans* e 8 *Streptococcus sobrinus*). Quanto às contagens antes e após o bochecho de anti-sépticos, tanto o Periogard® quanto o Cepacol® foram eficazes na

redução microbiana. Para o Periogard[®], observou-se uma redução de 5 logs para EGM; uma redução de 4 logs para estafilococos e BGN; e para as leveduras de 2 logs. Quanto ao Cepacol[®] a redução foi de 5 logs para EGM; 4 logs para os estafilococos; 3 logs para BGN e de 1 log para as leveduras. A concentração inibitória mínima (CIM) para os EGM variou de 0,06-0,48µg/mL para o Periogard[®] e 0,05-0,2µg/mL para o Cepacol[®]; estafilococos de 0,0002344-0,0009375µg/mL para o Periogard[®] e 0,003125-0,1µg/mL para o Cepacol[®]; bastonetes Gram negativos de 0,001875-0,12µg/mL para o Periogard[®] e 0,0125-0,2µg/mL para o Cepacol[®] e para as leveduras de 0,0075-0,06µg/mL para o Periogard[®] e 0,003125-0,025µg/mL para o Cepacol[®]. *In vitro*, os anti-sépticos testados também foram eficazes contra os microrganismos isolados. A CIM para os estafilococos variou de 6-96µg/mL para a amoxicilina; 8-64µg/mL para azitromicina e 40-1280µg/mL para o sulfametoxazol-trimetoprim; bastonetes Gram negativos variou de 12-768µg/mL para a amoxicilina; 3-96µg/mL para azitromicina e 10-1280µg/mL para o sulfametoxazol-trimetoprim. O uso de antimicrobianos para a profilaxia de infecções oportunistas em pacientes HIV positivos é largamente empregado, todavia a emergência da resistência microbiana é preocupante, principalmente com relação ao sulfametoxazol-trimetoprim. Concluindo, a detecção de altas contagens microbianas na saliva e a emergência de cepas resistentes é um dado importante, uma vez que esses microrganismos são fontes potenciais de infecção e, portanto, o uso de anti-sépticos deve ser indicado como coadjuvante ao procedimento mecânico de higienização.

Palavras chave: saliva, microrganismos, antimicrobianos, resistência microbiana, portadores do HIV.

Abstract

The mouth harbored a great variety of microorganisms and the coexistence of this microbiota with the buccal health depends on the conditions of immunologic system, processes of adaptation and continuous readaptation between host and microorganisms. With immunosuppression by HIV, the balance of the buccal microbiota may be altered, and opportunistic infections can occur. This study aimed to isolate, to identify and to determine the susceptibility of microorganisms isolated from saliva of human immunodeficiency virus infected patients. Two saliva samples not stimulated (2,0mL) were collected, in sterilized tubes, of each patient. The first saliva sample was collected before any intervention of the professional. The second was done after instructions of buccal hygiene, supervised hygiene and mouthwashed for one minute with Periogard[®] or Cepacol[®]. The saliva was diluted and dropped onto SB20 agar for MS isolation, on manitol agar for staphylococci, on MacConkey agar for Gram negative rods and on Sabouraud agar for yeasts isolation. After the incubation period, the characteristic colonies were counted and submitted to the biochemical identification and susceptibility tests (Periogard[®], Cepacol[®], amoxicilin, azitromicin and trimethoprim-sulfamethoxazole). It was isolated 168 microorganisms from saliva of 56 patients and the strains identified as 54 yeasts (42 *Candida albicans*, 10 *C. parapsilosis* and 2 *C. glabrata*); 43 Gram negative rods (34 *Enterobacter cloacae* and 9 *Pseudomonas aeruginosa*); 42 staphylococci (34 *Staphylococcus aureus* and 8 *negative coagulase*); 29 Mutans streptococci (21 *Streptococcus mutans* and 8 *Streptococcus sobrinus*). Periogard[®] and Cepacol[®] were efficient for reduction of microorganisms. For the Periogard[®] was observed a reduction of 5 logs for MS, 4 logs for staphylococci and Gram negative rods and 2 logs for yeasts. About the Cepacol[®] the reduction was 5 logs for MS, 4 logs for staphylococci, 3 logs for Gram negative rods and 1 log for yeasts. The MICs of MS ranged from 0.06-0.48µg/mL for Periogard[®] and 0.05-0.2µg/mL for Cepacol[®]; staphylococci from 0.0002344-0.0009375µg/mL for Periogard[®] and 0.003125-0.1µg/mL for Cepacol[®]; Gram negative rods from 0.001875-0.12µg/mL for Periogard[®] and 0.0125-0.2µg/mL for Cepacol[®] and yeasts from 0.0075-0.06µg/mL for Periogard[®] and 0.003125-0.025µg/mL for Cepacol[®]. The staphylococci MICs ranged from 6-96µg/mL for amoxicilin,

8-64 μ g/mL for azitromicin and 40-1280 μ g/mL for trimethoprim-sulfamethoxazole; Gram negative rods ranged from 12-768 μ g/mL for amoxicilin, 3-96 μ g/mL for azitromicin and 10-1280 μ g/mL for trimethoprim-sulfamethoxazole. *In vitro*, the antiseptics tested were also efficient against the microorganisms. The antimicrobial prophylactic administration for opportunistic processes in HIV infected patient is widely used, however it is preoccupying the emergency of microbial resistance mainly in relationship to the trimethoprim-sulfamethoxazole. Concluding, the detection of high microbial counts in saliva and the emergency of resistant strains are relevant informations, once these microorganisms are potential sources of infection and therefore buccal antiseptic should be used as accessory of mechanical hygiene.

Key words: saliva – microorganisms – antimicrobial – microbial resistance - human immunodeficiency virus infected patients.

1. Introdução

Em 1981 o serviço de epidemiologia do CDC (Center for Diseases Control and Prevention), Atlanta, Georgia (USA) detectava, com a colaboração de laboratórios especializados, a ocorrência de uma nova síndrome (AIDS- Acquired Immunodeficiency Syndrome), com características clínicas e imunológicas, associadas a processos infecciosos diversos e, eventualmente uma neoplasia, denominada de angiossarcoma de Kaposi (Lacaz 1985).

Estima-se que existam mais de quarenta milhões de pessoas infectadas pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana) em todo o mundo, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (2004). No Brasil, desde o início da década de 80 até 30/06/2004 foram notificados, pelo Ministério da Saúde, 362.364 casos de AIDS. Desses 251.050 são do gênero masculino e 111.314 são do gênero feminino. Na distribuição dos casos por local de residência, de 1980-2004, a região Centro-Oeste totalizou 20.252 casos, sendo que no estado de Goiás, o número de casos é de 7.217, e no município de Goiânia, esses números correspondem a 2.767 casos.

A característica da infecção pelo HIV é a depleção dos linfócitos T auxiliares-indutores que expressa o marcador fenotípico CD4 em sua superfície. As alterações nas células T4 causadas pela infecção são devastadoras, pois o linfócito T4 tem um papel crítico na resposta imune humana (Jawetz et al. 2000).

A microbiota bucal inclui, dentre outros microrganismos, bactérias, que provocam desmineralização do esmalte e da superfície da raiz, portanto promovendo lesões cariosas. Os principais microrganismos associados às lesões de cárie são: *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* (Crossner 1981; Murray 1996). Os estreptococos do grupo mutans predominam no biofilme dentário (placa dentária), devido à sua

capacidade de produzir polissacarídeos solúveis e insolúveis e altas concentrações de ácidos. São amplamente influenciados pelo conteúdo de carboidratos da dieta alimentar e pela frequência de ingestão. Crianças infectadas pelo HIV possuem os mesmos fatores de suscetibilidade à cárie que crianças não infectadas, excetuando o fator hospedeiro (Thylstrup & Fejerskov 1995). Madigan et al. (1996) mostraram que crianças HIV positivas apresentavam níveis de estreptococos do grupo mutans e lactobacilos mais elevados que seus irmãos não infectados, e que apesar desses dois grupos terem frequência de ingestão de açúcar similar, as crianças infectadas eram mais suscetíveis aos efeitos da exposição freqüente aos carboidratos que as outras.

A saliva tem função importante na manutenção de um equilíbrio apropriado no ecossistema associado às superfícies dos dentes. A xerostomia somada ao sistema imune debilitado, características dos pacientes infectados pelo HIV, resultam em altos índices de *S. mutans* e conseqüentemente maior incidência de cárie (Bretz et al. 2000).

Estafilococos são membros da microbiota humana da pele, das vias respiratórias e do trato gastrointestinal, causando algumas vezes infecções quase sempre associadas a dispositivos e aparelhos implantados, sobretudo em pacientes muito jovens, idosos e imunocomprometidos (Jawetz et al. 2000).

Senthilkimar et al. (2001) estudaram 53 homens portadores do HIV que tiveram 57 episódios de bacteremia por *S. aureus*. A incidência dessa bacteremia (por 1000 pacientes hospitalizados) foi de 13,2 entre homens HIV positivos e 0,8 entre homens HIV negativos.

Tanner & Stillman (1993) relataram que a microbiota bucal dos pacientes HIV negativos é similar a dos HIV positivos. Entretanto, as espécies de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus sanguis* e *Candida albicans* que usualmente não são associadas com sítios de periodontite progressiva aparecem nos sítios periodontais

comprometidos dos pacientes HIV positivos. Algumas espécies entéricas extrabucais também foram detectadas como *Enterococcus* sp, *Clostridium* sp, *Klebsiella* sp, *Bacteroides fragilis* e *Fusobacterium* sp.

As bactérias Gram negativas estão associadas a infecções humanas, incluindo 30 a 35% de todos os casos de sepse, mais de 70% das infecções das vias urinárias e muitas infecções intestinais. Alguns gêneros como *Salmonella* e *Shigella*, além de *Yersinia pestis* estão sempre associadas a infecções, enquanto outras como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* são membros da microbiota indígena do intestino e podem causar infecções oportunistas (Murray et al. 2000; Kovacs et al. 1997).

Schimid-Westhausen et al. (1990) observaram a presença de enterobactérias em raspados bucais de 5% de pacientes HIV positivos. Apesar desses estarem colonizados pelas bactérias Gram negativas e apresentarem candidíase hiperplásica ou eritematosa e GUNA (gengivite ulcerativa necrosante aguda), não foi possível fazer uma correlação causal entre a presença desses microrganismos e os processos mencionados.

Candida albicans é o principal patógeno humano do gênero *Candida* associado às infecções fúngicas invasivas. É comumente encontrada em indivíduos saudáveis, fazendo parte da microbiota autóctone. Espécies como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* também têm sido relacionadas às infecções fúngicas (Pichová et al. 2001). As espécies não *albicans* são responsáveis por 10% das candidemias nosocomiais e por 10% da candidíase orofaríngea que é a infecção mais comum na mucosa dos pacientes infectados pelo HIV (Beck-Sagué & Jarwis 1993). Segundo Penzack & Gubbins (1998), 80 a 95% desses pacientes irão apresentar um episódio de candidíase orofaríngea durante o curso da sua doença e dois terços terão este sinal clínico como início da doença sintomática.

Sant'ana et al. (2002) investigaram a presença, distribuição, sorotipo e suscetibilidade a antifúngicos de *Candida* spp isolada da boca de 130 pacientes com AIDS de seis centros universitários brasileiros, concluindo que os portadores estavam infectados principalmente por *C. albicans* sorotipo A, a maioria suscetíveis aos agentes antifúngicos utilizados (derivados azólicos).

Silva et al. (1998) coletaram 86 amostras da mucosa oral de pacientes com AIDS observando 59 (68,6%) amostras positivas para o gênero *Candida*; identificando 52 (88,13%) *C. albicans*, 4 (6,77%) *C. tropicalis* e 3 (5,08%) *C. krusei*. Foram detectadas cepas resistentes aos derivados azólicos, sendo 25,42% ao itraconazol, 45,76% ao cetoconazol e 66,10% ao fluconazol.

O uso de antimicrobianos é freqüente na odontologia, seja na profilaxia, evitando a ocorrência de um desequilíbrio da microbiota quando os métodos mecânicos são ineficientes, ou na terapia, visando eliminar os microrganismos predominantes relacionados com infecções bucais, objetivando a manutenção do biofilme ecológico existente no hospedeiro (Dajani et al.1997).

As principais classes de agentes antimicrobianos são: antibióticos, agentes catiônicos, enzimas, íons metálicos, halogênios, agentes fenólicos e extratos de plantas. Os agentes catiônicos são em geral mais potentes, pois ligam-se imediatamente a superfície bacteriana, carregada negativamente (Emilson 1994).

A clorexidina é um dos agentes mais estudados e o mais potente. É classificada quimicamente como uma bis-guanidina, apresentando propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas (Thylstrup & Fejerskov 1995). Possui largo espectro bacteriano, alta substantividade, é segura e efetiva (Corrêa 1998). A clorexidina atua na desorganização geral da membrana celular e inibição específica de proteínas da membrana; interfere na incorporação de glicose pelos *S. mutans* e reduz a atividade proteolítica de

Porphyromonas gingivalis (Cury 1997). Pode ser veiculada em dentifrícios, géis, vernizes ou soluções, entretanto, seu uso em dentifrícios pode ser indevido, pois estes geralmente contêm detergentes que são incompatíveis com a clorexidina, reduzindo sua ação. Na forma de solução, a concentração preferida é de 0,12%, utilizadas duas vezes ao dia (Adams et al. 1994). A clorexidina é em geral mais efetiva contra estreptococos do grupo mutans que as outras classes, menos eficaz contra leveduras e bactérias Gram negativas (Emilson 1994).

O cloreto de cetilpiridínio é um composto de amônia quaternária amplamente utilizado em bochechos devido a suas propriedades antimicrobianas. Sua ação ocorre por ligações catiônicas muito semelhantes a que ocorre com a clorexidina. O mecanismo de ação está relacionado com o aumento da permeabilidade da parede celular, favorecendo a lise, diminuindo o metabolismo celular e a habilidade do microrganismo em se aderir à superfície dentária (Bonesvol et al.1978).

Segundo Gjermo (1989), a atividade antimicrobiana do cloreto de cetilpiridínio é igual ou melhor que a da clorexidina, mas a sua propriedade de inibição do biofilme dentário é inferior. Esta diferença na atividade antibiofilme pode estar relacionada ao fato de perder parte de suas propriedades antimicrobianas com sua adsorção nas superfícies. Estes agentes estão disponíveis em um veículo alcoólico de 14 a 18%, com um pH entre 5,5 e 6,5 e são recomendados para o uso duas vezes ao dia.

Minquio et al. (1999) realizaram um estudo para avaliar *in vitro* a ação antimicrobiana de colutórios disponíveis no mercado nacional sobre 22 cepas indicadoras, sendo seis cepas padrão e 16 cepas-teste, isoladas da saliva de indivíduos saudáveis e concluíram que os produtos a base de triclosan são os mais eficazes para inibição da microbiota bucal, enquanto que os produtos a base de cloreto de cetilpiridínio são eficazes para a inibição de *S. aureus* (cepas-teste).

A terapia sistêmica coadjuvante com antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas, eritromicina, clindamicina, ampicilina, cloranfenicol, tetraciclina, metronidazol tem demonstrado eficiência na diminuição de certas infecções bucais, levando a uma melhoria nos parâmetros clínicos e microbiológicos, objetivando a supressão ou erradicação do biofilme patogênico (Fonseca 1984).

O uso de agentes antimicrobianos para profilaxia de doenças oportunistas nestes pacientes é bastante difundido. Algumas das manifestações oportunistas mais freqüentes são: candidíase oral, pneumonia por *P. carinii* (PCP), toxoplasmose cerebral, criptococose, histoplasmose, citomegalovirose, isosporíase e criptosporidíase. Para o tratamento da candidíase, criptococose e histoplasmose utilizam-se agentes antifúngicos como os derivados azólicos e anfotericina B. Para prevenir e tratar a PCP e a isosporíase administra-se o sulfametoxazol-trimetoprim. As doses profiláticas são baixas e por tempo indeterminado. O uso da azitromicina está relacionado ao tratamento e profilaxia da toxoplasmose cerebral e pneumocistose (Andrade & Pereira 2003).

A higiene bucal inadequada bem como a existência de biofilmes patogênicos pode produzir bacteremias transitórias mesmo na ausência de procedimentos odontológicos. A incidência e a magnitude das bacteremias de origem bucal são diretamente proporcionais ao grau de inflamação ou infecção em um hospedeiro susceptível (Pallasch 1996).

O restabelecimento da saúde bucal em indivíduos portadores do HIV é um desafio, pois a higiene bucal deve ser realizada com motivação, dedicação e esmero. Contudo, tais indivíduos estão sujeitos a inúmeras intempéries que acabam por influir até mesmo nos hábitos mais simples e de fácil execução.

O principal procedimento no tratamento das infecções é a remoção da causa. Em vista disso, têm sido utilizados agentes antimicrobianos como auxiliares importantes na

terapêutica das infecções, criando condições para que o hospedeiro possa eliminar os agentes causais de maneira mais rápida e eficaz.

Tendo em vista a falta de dados sobre a microbiota bucal de adultos portadores do HIV e objetivando diminuir o risco de cárie, doença periodontal e outras infecções bucais que esses indivíduos possuem, este estudo utiliza testes microbiológicos *in vivo* e *in vitro* com o intuito de caracterizar a microbiota bucal e observar o efeito de substâncias antimicrobianas mais comumente utilizadas no consultório odontológico, para então atuar com conhecimento frente às manifestações bucais apresentadas.

2. Objetivos

Geral

Contar, isolar, identificar e determinar o perfil de suscetibilidade de microrganismos isolados da saliva de adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana antes e após o bochecho com anti-sépticos.

Específicos

2.1 - Isolar e identificar estreptococos do grupo mutans, estafilococos, bastonetes Gram negativos e leveduras da saliva dos portadores do HIV;

2.2 - Verificar as unidades formadoras de colônias (ufc/mL de estreptococos do grupo mutans, estafilococos, bastonetes Gram negativos e leveduras antes e após bochecho com Periogard® e Cepacol®.

2.3 - Determinar *in vivo* a eficácia do Periogard® e Cepacol® na redução da microbiota bucal dos portadores do HIV.

2.4 - Determinar a suscetibilidade *in vitro* dos microrganismos isolados da saliva de adultos portadores do HIV a dois anti-sépticos bucais (Periogard® Cepacol®) por meio da concentração inibitória mínima (CIM).

2.5 - Determinar a suscetibilidade *in vitro* dos estafilococos e bastonetes Gram negativos isolados da saliva de adultos portadores do HIV a três antimicrobianos: amoxicilina, azitromicina e sulfametoxazol-trimetoprim por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

3. Material e Método

3.1 - Seleção dos pacientes

Foram estudados cinquenta e seis (56) indivíduos portadores do HIV, atendidos no Consultório Odontológico do Hospital de Doenças Tropicais (HDT)- Anuar Auad em Goiânia, Goiás, no período de agosto a dezembro de 2003. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do HDT (Anexo A) e os pacientes orientados sobre a pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, conforme Anexo B.

Todos os pacientes convidados aceitaram participar do estudo. Antes da coleta foi preenchida uma ficha de Anamnese pela pesquisadora. A ficha foi proposta pela mesma e se encontra no Anexo C. As características dos indivíduos estudados serão abordadas nos resultados.

Foram coletadas, em tubos esterilizados, duas amostras de saliva não estimulada (2,0mL) de cada paciente. A primeira coleta de saliva foi realizada antes de qualquer intervenção do profissional. A segunda foi realizada após instruções de higiene bucal, realização de escovação supervisionada, uso de fio dental e bochecho por um minuto com Periogard® ou Cepacol® por serem os anti-sépticos mais utilizados na odontologia.

As coletas foram realizadas no período da manhã, entre 10:00 e 12:00horas. As amostras foram transportadas em caixa de isopor sem gelo, com prazo máximo de trinta minutos, para o Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, limitando o tempo decorrido do início ao final dos procedimentos para a semeadura ao máximo de duas horas e meia.

3.2 - Isolamento dos estreptococos do grupo mutans

Amostras de saliva (2,0mL) não estimulada foram coletadas, homogeneizadas e após a diluição decimal seriada, semeadas de acordo com Westergren & Krasse (1978) em placas de Petri contendo ágar SB20 (Davey & Rogers 1984; Torres 1991). As placas

foram incubadas em microaerofilia em jarra de anaerobiose durante 72 horas a 37°C. A identificação e a contagem das colônias com características dos estreptococos pertencentes ao grupo mutans foram realizadas sob luz refletida com o auxílio de um microscópio estereoscópio. As colônias com características típicas de SGM tais como: colônias convexas, opacas e com aparência de vidro esmerilhado, foram contadas e repicadas em caldo tioglicolato de sódio e incubadas a 37°C por 24 horas para a identificação bioquímica.

As provas bioquímicas para identificação das cepas de SGM foram: fermentação do manitol, sorbitol, rafinose, melibiose e lactose, resistência a bacitracina, produção de peróxido de hidrogênio, esculina e arginina (Ito, Albuquerque & Alonso-Verri 1993).

3.3 - Isolamento de estafilococos

As amostras de saliva foram semeadas também em placas de Petri contendo ágar manitol e incubadas em microaerofilia a 37°C por 48 horas para isolamento de estafilococos. A identificação e a contagem das colônias características foram realizadas sob luz refletida com o auxílio de um microscópio estereoscópio e confirmação pelas características microscópicas após a coloração de Gram. Posteriormente foram realizadas outras provas bioquímicas como:

a) Produção de catalase

As colônias características de estafilococos foram submetidas ao teste da catalase em lâmina. Células retiradas do centro da colônia foram colocadas na superfície de uma lâmina de vidro, adicionando-se em seguida 1 gota de peróxido de hidrogênio. A reação positiva de catalase se observou pelo rápido aparecimento e produção sustentada de bolhas de gás ou efervescência (Koneman et al. 2001).

b) Produção de coagulase

A produção de coagulase pelas cepas foi verificada através da leitura de dois testes: coagulase aderida e coagulase livre.

Para a verificação da coagulase aderida, foi utilizado o método em lâmina, onde uma gota de plasma citratado de coelho foi misturada com uma suspensão homogênea densa em uma gota de salina esterilizada sobre uma lâmina histológica. As leituras da aglutinase (coagulase aderida) foram realizadas pela observação de aglutinação em 1-3 minutos.

Para a verificação da coagulase livre foi utilizado o método em tubo. As cepas foram repicadas em ágar infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Um pequeno inóculo da colônia foi emulsionado com alça de platina em 0,5 mL de plasma de coelho citratado, diluído a 1:5 em salina esterilizada. Os tubos foram incubados a 37°C e as leituras realizadas após 2, 8 e 24 horas. As provas foram consideradas positivas quando da formação de coágulo no tubo e em lâmina (Koneman et al. 2001).

c) Produção de Penicilinase

Este teste foi realizado de acordo com a técnica proposta por Haight & Finland (1952). A produção de penicilinase foi observada em placas de Petri contendo ágar BHI suplementado com 0,003U/mL de penicilina. A este preparado foi adicionado 2% de um caldo de cultura pura de 24 horas de *Micrococcus luteus*. Os isolados a serem testados foram inoculados na superfície do ágar com o auxílio do replicador de Steers, e as placas incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, o teste foi considerado positivo quando se observou ao redor da colônia produtora de penicilinase a formação de um halo de crescimento de *Micrococcus luteus*. Esse microrganismo funciona como marcador biológico, uma vez que esse é inibido por concentrações mínimas do antibiótico.

d) Prova da sensibilidade à oxacilina

Este teste foi realizado em placas de Petri contendo ágar Mueller-Hinton suplementado com 4% de NaCl e 6 µg de oxacilina por mL, no intuito de detectar cepas de estafilococos resistentes à meticilina (MRS). Os estafilococos foram repicados em caldo BHI e incubados a 37°C por 24 horas. Após esse período, foram inoculados nas placas com o auxílio do replicador de Steers e incubados a 37°C com realização da leitura após 24 e 48 horas (Steers et al. 1959).

O crescimento de uma colônia foi indicativo de resistência à meticilina e a prova considerada positiva (Chambers 1997).

3.4 - Isolamento bastonetes Gram negativos fermentadores (enterobactérias)

Para o isolamento de enterobactérias, alíquotas de saliva foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias desenvolvidas foram observadas quanto às características macroscópicas e fermentação da lactose. As demais provas bioquímicas realizadas foram: uso do ágar tríplice açúcar ferro (TAF), produção de gás, produção de sulfeto de hidrogênio, utilização do citrato, produção de uréase, produção de fenilalanina desaminase, prova do vermelho de metila, produção de indol, motilidade, fermentação da glicose, lactose, sacarose e manitol (Koneman et al. 2001).

3.5 – Isolamento de bastonetes Gram negativos não fermentadores

Para o isolamento de bastonetes Gram negativos não fermentadores, alíquotas de saliva foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias desenvolvidas foram observadas também quanto às características macroscópicas em ágar eosina-azul-de-metileno. As provas bioquímicas realizadas foram: oxidase, motilidade, hemólise em ágar sangue de carneiro, utilização

de aminoácidos (ornitina, lisina e arginina), produção de indol, utilização do citrato e crescimento a 42°C em caldo BHI (Koneman et al. 2001)

3.6 - Isolamento de leveduras

Para o isolamento de leveduras, amostras de saliva foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose, incubadas a temperatura ambiente. As colônias foram submetidas a testes de identificação clássicos como formação de tubo germinativo, produção de clamidoconídio e assimilação de hidratos de carbono com os seguintes açúcares: glicose, maltose, galactose, lactose, sacarose, rafinose, celobiose, xilose e trealose (Kurtzman et al. 1998).

3.7- Determinação *in vitro* da suscetibilidade dos estreptococos do grupo mutans, estafilococos, bastonetes Gram negativos e leveduras a dois anti-sépticos bucais.

Os microrganismos isolados também foram submetidos ao teste de suscetibilidade *in vitro* aos anti-sépticos: Periogard® (Colgate-Palmolive Ltda, São Paulo) com gluconato de clorexidina a 0,12% e Cepacol® (Merrel Lepetit Farmacêutica e Industrial Ltda, São Paulo) contendo 0,5mg de cloreto de cetilpiridínio. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de diluição em ágar, recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS (2004)*, em virtude das condições técnicas, considerando que para leveduras o teste padrão ouro é o de microdiluição em caldo padronizado pelo documento M27-A2 (NCCLS 2002).

Os resultados da suscetibilidade dos microrganismos aos anti-sépticos estão expressos em função da concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL, calculada em função da concentração do princípio ativo descrito no rótulo da forma farmacêutica do produto comercial. Foram preparadas diferentes diluições seriadas dos anti-sépticos e o

Periogard® foi avaliado nas concentrações que variaram de 0,06 a 0,48µg/mL para estreptococos do grupo mutans (EGM), de 0,00023344 a 0,0009375µg/mL para estafilococos, de 0,001875 a 0,12µg/mL para bastonetes Gram negativos (BGN) e de 0,0075 a 0,06µg/mL para leveduras. O Cepacol® foi avaliado nas concentrações que variaram de 0,05 a 0,2µg/mL para EGM, de 0,003125 a 0,1µg/mL para estafilococos, de 0,0125 a 0,2µg/mL para BGN e de 0,003125 a 0,025µg/mL para leveduras. Foi considerada a CIM a maior diluição em que não se observou desenvolvimento microbiano.

3.8- Determinação *in vitro* da suscetibilidade dos estafilococos e bastonetes Gram negativos a três antimicrobianos

Os estafilococos e bastonetes Gram negativos isolados também foram submetidos ao teste de suscetibilidade a três antimicrobianos: amoxicilina, azitromicina e sulfametoazol-trimetoprim. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de diluição em ágar, recomendado pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS (2004)*.

Foram preparadas diferentes diluições seriadas dos antimicrobianos a partir da concentração da droga no soro (ponto crítico). Para a amoxicilina o ponto crítico é de 6µg/mL, a azitromicina de 8µg/mL e para o sulfametoazol-trimetoprim é de 40µg/mL.

4. Resultados

Os resultados estão apresentados na forma de três artigos científicos.

Referências Bibliográficas

- Adams D, Addy M 1994. Mouthrinses. *Adv Dent Res* 8: 291-301.
- Andrade JG, Pereira, LIA 2003. Manual prático de doenças transmissíveis. 6ed. IPTSP/ UFG, Goiânia, 84-86.
- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496.
- Beck-Sagué CM, Jarvis W 1993. National Nosocomial Fungal Surveillance System Trends in the Epidemiology of Nosocomial Fungal Infections in the United States. *J Infect Dis* 167: 1247-1251.
- Bonesvol P, Gjermo P 1978. A comparison between chlorhexidine and some quaternary ammonium compounds with regard to retention, salivary concentration and plaque inhibiting effect in the human oral cavity after mouthrinses. *Arch Oral Biol* 289-294.
- Bretz WA, Flaits C, Moretti A, Corby P, Schneider LG, Nichols CM 2000. Medications usage and dental caries outcome-related variables in HIV/AIDS patients. *AIDS Patients care* 10: 549-554.
- Chambers HF 1997. Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 10: 781-791.
- Corrêa MSNP 1998. Odontopediatria na primeira infância. São Paulo, Editora Santos, 679 p.
- Crossner CG 1981. Salivary lactobacillus counts in the prediction of caries activity. *Community Dentistry Oral Epidemiology* 9: 182.
- Cury JA 1997. Controle químico da placa dental. In: Kriger L. *ABOPREV: Promoção de saúde bucal*, Editora Artes Médicas, São Paulo, 7: 129-140.
- Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P, Gewitz MH, Shulman ST, Nauri SN, Newburger JW, Hutto C, Palasch TJ, Gage TW, Levison ME, Peter G, Zucaro GJ 1997. Prevention of bacterial endocarditis. *JAMA* 277:1794-1802.
- Davey AL, Rogers RSAH 1984. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Archs Oral Biol* 29: 453-60.
- Emilson CG 1994. Potencial efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res* 73: 682-91.

Fonseca AL 1984. Antibióticos na clínica diária. Editora Epume, Rio de Janeiro, 33:

441-454.

Gjeramo P 1989. Chlorhexidine and related compounds. *J Dent Res* 68: 1602-1608.

Haight TH, Finland M 1952. Modified Gots test for penicillinase production. *Am J Clin Pathol* 8: 806-808.

Ito IY, Albuquerque Jr RF e Alonso-Verri R 1993. Estreptococos: modificação na técnica de identificação das cepas isoladas da cavidade oral. In: Anais da 15ª Jornada Odontológica de Ribeirão Preto-USP, p.5.

Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS, Ornston LN 2000. Microbiologia Médica. Editora Guanabara Koogan, p 463-471.

Koneman EW, Allen SD, Dowell VRJR, Sommers RSHM 2001. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5ª ed. São Paulo.

Kovacs A, Leaf HL, Simberkoff MS. 1997. Bacterila infection. *Med Clin North Am* 2: 319-43.

Kurtzman CP, Fell JW 1998. The yeast, a taxonomic study. Fourth edition, Elsevier.

Lacaz CS. 1985 AIDS (SIDA): Doutrina, Aspectos Iatrofilosóficos, Infecções Oportunistas Associadas. São Paulo, SARVIER, 1-123.

Madigan A, Murray PA, Houpt M, Catalanotto F, Feuerman MS 1996. Caries experience and cariogenic markers in HIV positive children and their siblings. *Ped. Dentistry* 18(2):129-136.

Ministério da Saúde – Secretaria de Vigilância em Saúde- Programa Nacional de DST e Aids 2004. Boletim Epidemiológico Aids e DST, ano XVIII, no 1- 1ª à 26ª semanas epidemiológicas- janeiro a junho.

Minquio JÁ, Mian H, Pimenta FC, Ito IY 1999. Ação antimicrobiana de colutórios disponíveis no mercado contra 22 cepas indicadoras *in vitro*. In: Reunião científica

da Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas, 16 Águas de São Pedro. Anais. São Paulo: SBPqO 199p.

Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi, GS, Pfaller MA 2000. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan 193p.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*; Approved Standard, Wayne PA. *NCCLS 23*.

NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standard 2002. Publication M27-A: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard, Wayne PA. *NCCLS 17*:1-29.

OMS- Organização Mundial de Saúde 2004. *Rapport sur l'épidémie mondiale de SIDA* Genève, ONUSIDA.

Pallasch TJ 1996. Antibiotic prophylaxis and the medically compromised patient. *Periodontology 10*:107-138.

Penzak SR, Gubbins PO 1998. Preventing and treating azole-resistant oropharyngeal candidiases in HIV infected patients. *Am J Health Syst Pharm 55*: 279-283.

Pichová I, Pavlicková L, Dostal J, Dolejsi E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, Ruml T, Soucek M 2001. Secret aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem 268*: 2669-2677.

Sant'ana PL, Milan EP, Marinez R, Telles FQ, Ferreira MS, Alcântara AP, Carvalho MT, Colombo AL 2002. Multicenter brazilian study of oral *Cândida* species isolated from AIDS patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz 97*(2):253-7.

Schimid-Westhausen A, Fehrenbach FJ, Reichart PA 1990. Oral enterobacteriaceae in patients with HIV infection. *J Oral Pathol Med 19* (5): 229-231.

Senthilkumar A, Kumar S, Shereagren JN 2001. Increased incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia in hospitalized patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis Illinois 33* (8):1412-6.

- Silva MRR, Paula CR, Silva SC, Costa TR, Costa MR 1998. Drug resistance of yeasts isolated from oropharyngeal candidiasis in aids patients. *Rev Microbiol* 29 (4): 271-275.
- Steers E, Foltz EL, Graves VS 1959. an inocula replicating apparatus for continue testing of bacterial suscetibility to antibiotics. *Antibiot Chemother* 9: 307-311.
- Tanner A, Stillman N 1993. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens and treatment. *Clin Infec Dis* 16 (4): 304-309.
- Thylstrup A, Fejerskov O 1995. *Cariologia Clínica*, São Paulo, Editora Santos, p.421.
- Torres AS 1991. Avaliação do ágar SB20 e MSB na contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva e na placa dental de adolescentes. Araraquara, 124pp. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.
- Westergren G, Krasse B 1978. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 7: 82-83.

As referências bibliográficas estão de acordo com as normas da Revista da Fundação Oswaldo Cruz, 2003.

4.1 Artigos Científicos

4.1.1 – Contagem e identificação de microrganismos na saliva de portadores do vírus da imunodeficiência humana antes e após o bochecho com anti-sépticos

Artigo será submetido ao periódico Revista de Patologia Tropical.

Contagem e identificação de microrganismos na saliva de portadores do vírus da imunodeficiência humana antes e após bochecho com anti-sépticos

Cristyane Gonçalves Benicio Bastos Rocha¹, Cleomenes Reis², Fabiana Cristina Pimenta²

Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia.

1- Mestranda em Microbiologia, Programa de Mestrado em Medicina Tropical.

2- Professores Doutores do DMIPP/IPTSP/UFG.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás

Rua Delenda Rezende Melo, S/N CEP*-74605-050 Goiânia, Goiás, Brasil

Resumo

Infecções da mucosa bucal estão provavelmente relacionadas com a soropositividade para o HIV, bem como alterações no número e nas espécies microbianas. Objetivou-se identificar e quantificar os microrganismos na saliva de 56 adultos portadores do HIV antes e após o bochecho com os anti-sépticos Periogard[®] e Cepacol[®] e determinar CIM dos isolados para estes. Foram coletadas duas amostras de saliva não estimulada de cada paciente. A primeira coleta foi realizada antes de qualquer intervenção e, a segunda, após instruções e práticas de higiene bucal e bochecho com Periogard[®] ou Cepacol[®]. A determinação da CIM foi realizada pelo método de diluição em ágar. Foram isolados 54 leveduras, 43 BGN, 42 estafilococos e 29 EGM. As contagens microbianas antes e após o bochecho sofreram uma redução significativa para ambos anti-sépticos, considerando o Periogard[®] a redução foi de 5 logs para EGM; para estafilococos e BGN a redução foi de 4 logs e para as leveduras de 2 logs. O Cepacol[®]

promoveu uma redução de 5 logs para EGM, 4 logs para os estafilococos, 3 logs para BGN e um log para as leveduras. A CIM para os EGM variou de 0,06-0,48 μ g/mL para o Periogard[®]; 0,05-0,2 μ g/mL para o Cepacol[®]; estafilococos de 0,0002344-0,0009375 μ g/mL para o Periogard[®]; 0,003125-0,1 μ g/mL para o Cepacol[®]; bastonetes Gram negativos de 0,001875-0,12 μ g/mL para o Periogard[®]; 0,0125-0,2 μ g/mL para o Cepacol[®] e leveduras de 0,0075-0,06 μ g/mL para o Periogard[®] e de 0,003125-0,025 μ g/mL para o Cepacol[®]. Os indivíduos portadores do HIV apresentaram uma prevalência na saliva de *C. albicans*. É preocupante a presença de estafilococos e enterobactérias na saliva destes pacientes imunodeprimidos, uma vez que são patógenos virulentos, com capacidade de disseminação. O uso de anti-sépticos associados a uma higienização supervisionada reduz significativamente a carga microbiana destes indivíduos, devendo ser empregado.

Descritores: microrganismos, saliva, anti-sépticos, portadores do HIV.

Introdução

Desde a descrição do vírus da imunodeficiência humana (HIV), o número de indivíduos infectados continua aumentando de forma preocupante. As infecções oportunistas nesses hospedeiros têm se tornado um sério problema (Pfaller et al. 1998). As infecções bucais ocorrem como os primeiros sinais de manifestação pelo HIV ou até mesmo da AIDS (Brasil 1996), e normalmente essas infecções são causadas por membros da própria microbiota do hospedeiro. A microbiota bucal de indivíduos imunocompetentes é diferente da microbiota de pacientes HIV positivos observando-se alterações no número e nas espécies microbianas (Coleman et al. 1993). A persistência ou recorrência de infecções na boca pode refletir resistência à terapêutica ou progressão de doença generalizada (Magalhães 1996).

A cárie dentária é a doença infecciosa bucal mais comum que acomete o homem. Os principais agentes causais são os estreptococos do grupo mutans dos quais *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* são os agentes microbianos mais importantes na etiologia da cárie dentária devido à sua capacidade de aderência e colonização dos dentes. Pessoas infectadas pelo HIV apresentam o sistema imunológico suprimido e xerostomia, fatores estes que aumentam consideravelmente o risco a cárie (Madigan et al. 1996).

Staphylococcus aureus é uma causa comum de infecções em pacientes infectados pelo HIV. Senthilkumar et al. (2001) estudaram 53 homens do sexo masculino que apresentaram 57 episódios de bacteremia por *S. aureus*. A incidência por 1000 pacientes hospitalizados foi de 13,2 entre os HIV positivos e 0,8 entre HIV negativos.

Tanner & Stillman (1993) relataram que algumas espécies entéricas extra bucais estavam associadas com sítios de periodontite progressiva em pacientes HIV positivos (*Enterococcus* sp, *Clostridium* sp, *Klebsiella* sp, *Fusobacterium* sp). Schimd-Westhausen et al. (1990) detectaram a presença de enterobactérias em raspados bucais de 5% dos pacientes HIV positivos. Manfredi et al. (2001), em um estudo retrospectivo com dados clínicos e laboratoriais de 2517 pacientes HIV positivos hospitalizados, observaram episódios de infecções por *Enterobacter* spp apresentando uma elevada virulência, complicando o curso da doença.

Candida albicans é um microrganismo oportunista que infecta primariamente o hospedeiro imunocomprometido. Espécies de *Candida* são os principais agentes de infecções fúngicas nosocomiais, sendo a *C. albicans* a espécie mais comumente isolada (Fridkin et al.1996). Em recentes estudos têm sido descritas mudanças na população de *Candida* na microbiota em pacientes infectados pelo HIV, como a emergência de *C. não*

albicans (Nguyen et al. 1996). Estas mudanças têm sido particularmente associadas com o uso de agentes antifúngicos como o fluconazol (Ghannoum & Rice 1999).

A candidíase bucal é uma das mais importantes infecções oportunistas e acomete mais de 90% dos pacientes infectados pelo HIV (Korting et al. 1999). Uma outra complicação importante nesses pacientes é o comprometimento dos tecidos periodontais (Yeung 2000).

O desenvolvimento dessa gengivite está diretamente relacionado com o acúmulo de biofilme dentário (placa bacteriana) e alteração da imunidade celular (Nittayananta et al. 2001).

De acordo com Holmstrup & Westergaard (1998) e Lamster et al. (1998), a doença periodontal se apresenta de três formas principais nos pacientes HIV: eritema gengival linear (EGL), gengivite ulcerativa necrosante (GUN) e periodontite ulcerativa necrosante (PUN). Pacientes com EGL albergavam bactérias normalmente associadas à gengivite convencional, além da associação com *Candida*. Na microbiota associada a GUN encontram-se *Borrelia* sp e cocos Gram positivos. A periodontite ulcerativa necrosante (PUN) é caracterizada por uma rápida e severa perda do tecido periodontal (Holmstrup & Westergaard 1998). Indivíduos com essa periodontite geralmente apresentam os mesmos periodontopatógenos associados com a periodontite nos não infectados; embora tenham um aumento de espécies entéricas e *Candida* sp.

Os recursos mecânicos como escovação e uso do fio dental devem ser utilizados diariamente, porém muitas vezes não são executados adequadamente. Desse modo, diversas substâncias têm sido utilizadas para o controle químico do biofilme dentário, como adjuvantes aos procedimentos mecânicos (Devore 1994).

A clorexidina, princípio ativo do Periogard[®], tem se mostrado eficiente no controle químico do biofilme dentário. É uma bisguanidina catiônica com atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras, reduzindo a formação do biofilme (Ouhayoun 2003). O cloreto de cetilpiridínio presente no Cepacol[®] causa danos à membrana celular bacteriana, levando a uma perda da organização estrutural (Sreenivasan et al. 2002).

Em face do exposto este trabalho objetivou isolar, quantificar e identificar os microrganismos na saliva de adultos portadores do HIV antes e após bochecho com os anti-sépticos Periogard[®] e Cepacol[®], bem como determinar a concentração inibitória mínima de ambos. A escolha desses anti-sépticos deve-se ao fato de serem agentes indicados e utilizados na prática Odontológica (Anderson, Calder & Thomas 2000).

Material e Métodos

Foram estudados cinquenta e seis (56) indivíduos portadores do HIV, atendidos no consultório odontológico do Hospital de Doenças Tropicais (HDT) Anuar Auad em Goiânia, Goiás, no período de agosto a dezembro de 2003. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (HDT) e os pacientes orientados sobre a pesquisa e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram coletadas, em tubos esterilizados, duas amostras de saliva não estimulada (2,0 mL) de cada paciente. A primeira coleta de saliva foi realizada antes de qualquer intervenção do profissional. A segunda foi realizada após instruções de higiene bucal, realização de escovação supervisionada, uso de fio dental e bochecho por um minuto com Periogard® ou Cepacol®.

As amostras foram transportadas em caixas de isopor sem gelo para o Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. A saliva foi homogeneizada, em vortex, por um minuto e submetida a uma diluição decimal seriada em tampão fosfato de sódio (PBS) e 50µL semeados, pela técnica de gota (Westergren & Krasse 1978) em ágar SB20 (Davey & Rogers 1984; Torres 1991); para isolamento de EGM; em ágar manitol (estafilococos); ágar MacConkey (bastonetes Gram negativos) e ágar Sabouraud para a detecção de leveduras (Koneman et al. 2001).

A caracterização macroscópica e contagem das unidades formadoras de colônias (ufc) foram realizadas sob luz refletida com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Posteriormente foram realizadas provas bioquímicas para identificação das espécies isoladas (Koneman et al. 2001).

Os microrganismos isolados também foram submetidos ao teste de suscetibilidade *in vitro* ao Periogard® (Colgate-Palmolive Ltda, São Paulo) com gluconato de clorexidina a 0,12% e ao Cepacol® (Merrel Lepetit Farmacêutica e Industrial Ltda, São Paulo) contendo 0,5mg de cloreto de cetilpiridínio. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de diluição em ágar, recomendada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS* (2004). Foram preparadas diferentes diluições seriadas dos anti-sépticos e o Periogard® foi avaliado nas concentrações que variaram de 0,06 a 0,48µg/mL para estreptococos do

grupo mutans (EGM), de 0,00023344 a 0,0009375 μ g/mL para estafilococos, de 0,001875 a 0,12 μ g/mL para bastonetes Gram negativos (BGN) e de 0,0075 a 0,06 μ g/mL para leveduras. O Cepacol[®] foi avaliado nas concentrações que variaram de 0,05 a 0,2 μ g/mL para EGM, de 0,003125 a 0,1 μ g/mL para estafilococos, de 0,0125 a 0,2 μ g/mL para BGN e de 0,003125 a 0,025 μ g/mL para leveduras.

Resultados

Os cinqüenta e seis adultos apresentavam idades entre 19 a 57 (37,3 +/- 8,2) anos, sendo 17 gênero feminino (30,4%) e 39 (69,6%) masculino; 49 (87,5%) estavam fazendo acompanhamento ambulatorial com médicos infectologistas do HDT e sete (12,5%) pacientes do leito dia e apresentavam doença oportunística. Trinta e um (55,4%) não estavam usando medicamentos e 25 (44,6%) estavam fazendo terapia com anti-retrovirais e utilizando algum antimicrobiano. Os antimicrobianos mais usados eram: amoxicilina, azitromicina e sulfametoxazol + trimetoprim O tempo de diagnóstico da doença variou de 2 meses a 14 anos (média de 4 anos e 3 meses).

Foram isolados 168 microrganismos da saliva dos 56 adultos portadores do HIV. Esses isolados foram identificados, sendo 54 leveduras (42 *Candida albicans*, 10 *C. parapsilosis* e 2 *C. glabrata*); 43 bastonetes Gram negativos (34 *Enterobacter cloacae* e 9 *Pseudomonas aeruginosa*); 42 estafilococos (34 *Staphylococcus aureus*, 8 estafilococos coagulase negativos); 29 Estreptococos do grupo mutans (21 *Streptococcus mutans* e 8 *Streptococcus sobrinus*).

Foi observada uma redução significativa dos microrganismos no pós-bochecho. Os EGM foram os mais suscetíveis a ambos anti-sépticos, não sendo detectados após o bochecho. Os estafilococos e BGN apresentaram altas médias de contagens na ordem de

10⁵ ufc antes de qualquer procedimento de higienização e bochecho, porém no pós bochecho, a contagem foi reduzida para 10¹.

A tabela 1 apresenta a distribuição dos microrganismos isolados, bem como as médias das contagens realizadas antes e após o bochecho com anti-sépticos.

Com relação ao perfil de suscetibilidade dos isolados aos anti-sépticos, a concentração de clorexidina presente em 1mL de Periogard® (0,06µg) foi capaz de inibir as leveduras e estafilococos. O Cepacol® inibiu as leveduras, a maioria dos estafilococos e 63,7% dos BGN quando a sua concentração foi multiplicada em quatro vezes.

A tabela 2 apresenta o perfil de suscetibilidade dos microrganismos isolados frente aos anti-sépticos mostrando a faixa de atividade antimicrobiana para cada isolado.

Discussão

A manutenção ou o restabelecimento da saúde bucal em indivíduos portadores do HIV é um desafio, pois a higiene bucal deve ser feita com motivação e esmero. Assim, o controle químico, visando evitar o desequilíbrio da microbiota seria coadjuvante ao procedimento mecânico, considerando as dificuldades de manter os indivíduos motivados para uma limpeza adequada dos dentes (Cury 1997).

As infecções oportunistas são relevantes nos pacientes HIV positivos. Nos indivíduos com AIDS e candidíase orofaríngea, a *C. albicans* é seguida em frequência por *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e outras espécies não *albicans* (Hazen 1995, Coleman et al. 1998). Em pacientes infectados pelo HIV as espécies não *albicans* tem sido isoladas de 15 a 20 % dos pacientes e têm sido representadas em maior número por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (Barchiesi et al.1993; Milan et al. 1998). Nesse trabalho, observou-se 22,2% de espécies não

albicans, representado principalmente pela *C. parapsilosis*, o que difere dos dois estudos relatados.

Neste estudo observou-se a presença de enterobactérias representadas por *Enterobacter cloacae* em 34 (60,71%) dos indivíduos infectados pelo HIV. Um achado preocupante é a detecção de *Pseudomonas aeruginosa* em 9 indivíduos, pelo fato de se tratar de um microrganismo virulento que carrega genes de resistência antimicrobiana, associado a inúmeras infecções, inclusive hospitalares podendo ocasionar grave risco à saúde dos portadores, sobretudo dos imunodeprimidos. Tsang et al. (2000) determinaram o perfil de coliformes e leveduras isolados da boca de 32 pacientes infectados por HIV em Hong Kong. *Enterobacter cloacae* e *C. albicans* foram os mais comumente isolados, mostrando índices de 28,8% e 54,8% , respectivamente.

Infecções por bactérias não oportunistas são uma importante causa de morbidade e mortalidade para adultos e crianças infectados pelo HIV. Dentre os patógenos encontrados com mais freqüência está *S. aureus*, comumente associado ao uso de cateteres vasculares, uso de antibióticos e outros fatores de risco como a imunodepressão (Kovacs et al. 1997). Nesse estudo detectou-se a presença de (42) 75,0% de isolados de estafilococos na saliva, sendo 34 *S. aureus* e 8 ECN.

Estudos têm mostrado que a cárie está associada a um aumento das proporções de bactérias acidúricas e acidogênicas, especialmente os estreptococos do grupo mutans e *Lactobacillus* (Marsh 1999). Nos indivíduos estudados os EGM foram isolados em apenas 29 pacientes. Isto se deve à baixa freqüência de cárie observada nestes pacientes em consequência do acompanhamento e tratamento odontológico realizado no Consultório do HDT.

O Periogard® e o Cepacol® mostraram-se eficientes agentes anti-sépticos, reduzindo a carga microbiana no pós bochecho, principalmente a dos estreptococos do

grupo mutans. Jenkins et al. (1994) compararam três anti-sépticos utilizados na higiene bucal para inibir a formação do biofilme dentário e observaram uma maior efetividade dos bochechos contendo clorexidina e cloreto de cetilpiridínio que com triclosan.

Pimenta (2001) em um estudo sobre a prevalência de EGM da saliva de 136 membros de sete famílias verificou que os anti-sépticos testados (Plax[®], Cepacol[®] e Periogard[®]) foram efetivos contra SGM nas concentrações encontradas nas formulações comercialmente disponíveis (0,937 a 15,0µg/mL para o Periogard[®], 1,56 a 6,25µg/mL para o Cepacol[®] e de 1,87 a 7,5µg/mL para o Plax[®]). Os valores de CIM encontrados no trabalho citado diferem dos valores apresentados neste estudo. Na análise da ficha de anamnese, 46 (82,1%) dos pacientes relataram a não utilização de qualquer enxaguatório bucal, fato que poderia explicar a baixa resistência das cepas frente aos anti-sépticos.

A clorexidina apresentou uma melhor atividade contra os bastonetes Gram negativos quando comparada ao cloreto de cetilpiridínio (Tabela 2). A faixa de atividade variou de 0,01875 a 0,12 µg/mL para inibição de todos os bastonetes Gram negativos. O Cepacol[®] não foi capaz de inibir todos os BGN, mesmo quadruplicando a concentração da substância contida em 1mL da apresentação comercial.

Nas contagens de ufc/mL no pós-bochecho, tanto o Periogard[®] quanto o Cepacol[®] mostraram resultados significantes. *In vitro*, os dois anti-sépticos utilizados foram eficazes na redução da microbiota da saliva, com uma atividade menor do Cepacol[®] frente aos bastonetes Gram negativos.

É importante considerar ao avaliar a suscetibilidade de microrganismos bucais que a maioria destes se encontram consorciados em biofilme e, portanto, muito mais resistentes aos antimicrobianos. Contudo, os métodos utilizados para determinar a suscetibilidade se baseiam na CIM de culturas na forma planctônica. Desta forma, a

CIM é apenas um indicativo do perfil de suscetibilidade destes microrganismos no biofilme (Pratten, Barnett & Wilson 1998).

Conclusão

Os indivíduos portadores do HIV apresentaram uma prevalência na saliva de *C. albicans*, apesar da emergência de cepas não *albicans*. É preocupante a presença de microrganismos como os estafilococos e enterobactérias na saliva destes pacientes imunodeprimidos, uma vez que são patógenos virulentos, com capacidade de disseminação, associados a casos de infecções graves com alta morbidade. Os dois anti-sépticos testados são eficazes contra os microrganismos bucais isolados nas concentrações encontradas nas formulações comercialmente disponíveis. Assim, a maneira ideal de proporcionar boa higiene bucal é por meio de profilaxia mecânica, envolvendo escovação e uso de fio dental, e em vista das condições microbiológicas (alterações do número e espécies microbianas) apresentadas faz-se necessário o uso de substâncias químicas complementares como os anti-sépticos utilizados nesse trabalho.

Abstract

Buccal manifestations seem to be related with the soropositive for HIV, as well as alterations in the number and in the microbial species. It was aimed to identify and to quantify the microorganisms before and after the mouthwashes with antiseptic and to determine MICs of the isolated ones for Periogard[®] and Cepacol[®]. Two samples of saliva not stimulated of each patient one were collected. The first collection was accomplished before any intervention and the second were after instructions and practices of buccal hygiene and mouthwash with Periogard[®] or Cepacol[®]. The determination of MICs was accomplished by the dilution method in ágar. It was isolated 54 yeasts; 43 gram negative rods; 42 staphylococci and 29 mutans streptococci (MS).

The counts before and after mouthwash for Periogard[®] resulted in a reduction of 5 logs for MS, of 4 logs for staphylococci and Gram negative rods and of 2 logs for yeasts; Cepacol[®] resulted in a reduction of 5 logs for MS, 4 logs for staphylococci, 3 logs for Gram negative rods and 1 log for yeasts. The MICs of MS ranged from 0.06-0.48µg/mL for Periogard[®]; 0.05-0.2µg/mL for Cepacol[®]; staphylococci from 0.0002344-0.0009375µg/mL for Periogard[®]; 0.003125-0.1µg/mL for Cepacol[®]; Gram negative rods from 0.001875-0.12µg/mL for Periogard[®]; 0.0125-0.2µg/mL for Cepacol[®] and yeasts from 0.0075-0.06µg/mL for Periogard[®]; 0.003125-0.025µg/mL for Cepacol[®]. *C. Albicans* was the main isolated in saliva of HIV infected patients. The presence of staphylococci and enterobacteriaceae in the saliva have been reported as potential opportunistic pathogens. The use of antiseptic associated a supervised hygiene reduces these microbial load significantly.

Key words: microorganisms, saliva, human immunodeficiency virus, antiseptic.

Agradecimentos:

Laboratório de Micologia Professora Maria do Rosário Rodrigues Silva e da mestrande Karla Carvalho Miranda por terem colaborado na identificação das leveduras.

Referências bibliográficas.

1. Barchiesi F, Morbidutcci V, Ancarani F, Scalise. Emergence of oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans species of *Candida* in HIV- infected patients. *Eur J Epidemiol* 9:455-456, 1993.
2. Anderson F, Calder L and Thomas E. Antibiotics prescription in Canadian. *J Med Microbiol* 49:201-215, 2000.

3. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS. Hepatites, AIDS e Herpes na prática odontológica. Brasília, 1996.
4. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as opportunistic pathogens. *Med Mycol* 36:156-165, 1998.
5. Cury J A. Controle químico da placa dental. In: Kringer, L. *ABOPREV-Promoção de Saúde Bucal*. São Paulo. Artes Médicas: 255-281, 1997.
6. Davey AL, Rogers A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Archs Oral Biol*. 29:453-60, 1984.
7. Devore LR. Antimicrobial mouthrinses: impacto in dental hygiene. *J Am Dent Assoc* 125:23-28, 1994.
8. Fridkin SF, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol* 9:499-511, 1996.
9. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12:501-517, 1999.
10. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 8:462-478, 1995.
11. Holmstrup P, Westergaard J. HIV infection and periodontal diseases. *Periodontol* 18:37-46, 1998.
12. Jenkins S, Andy M, Newcombe RG. A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 21: 441-4, 1994.

13. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr., Sommers RS. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido*. 5ª ed., São Paulo, 2001
14. Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrobial Agents Chemother* 43:2038-2042, 1999.
15. Kovacs A, Leaf HL, Simberkoff MS. Bacterial infections. *Med Clin North Am* 81:319-43, 1997
16. Lamster IB, Grbic JT, Mitchell-Lewis DA, Begg MD, Mitchell A. New concepts regarding the pathogenesis of periodontal disease in HIV infection. *Ann Periodontol* 3: 62-75, 1998.
17. Madigan A, Murray P A, Houpt M, Catalanotto F, Feuerman M S. Caries experience and cariogenic markers in HIV positive children and their siblings. *Pediatr Dentistry* 18:129-136, 1996.
18. Magalhães MG. Lesões bucais em pacientes HIV positivos de diferentes categorias de transmissão. *RPG* 4:401, 1996.
19. Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Chiodo F. *Enterobacter spp.* infections complicating the course of HIV disease. *J Chemother* 13:195-201, 2001.
20. Marsh, PD. Microbiologic aspect of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43:599-614, 1999.

21. Milan EP, Burattini MN, Kallas EG, Fischman O, Costa PRO, Colombo AL. Azole resistance among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32:1115-1118, 1998.
22. NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2004. In: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard -Sixth Edition. Ferraro MJ (23) Number 2
23. Nguyen MH, Peacock JEtJr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 100:617-623, 1998.
24. Nittayananta W, Chanowanna N, Sriphanakul S, Winn T. Risk factors associated with oral lesions in HIV- infected heterosexual people and intravenous drug users in Thailand. *J Oral Pathol Med* 30:224-30, 2001.
25. Ouhayoun J. Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. *J Clin Periodontol* 30:10-12, 2003.
26. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Hollis RJ, Messer SA. International surveillance of bloodstream infections due to *Candida* species: frequency of occurrence and antifungal susceptibilities of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and South America for the SENTRY Program. The SENTRY Participant Group. *J Clin Microbiol* 36: 1886-1889, 1998.
27. Pimenta FC. Estreptococos do grupo mutans: fidelidade intrafamiliar [Tese de Doutorado em Microbiologia- UFRJ], 2001

28. Pratten J, Barnett P and Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms in oral bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* 64: 3515-3519, 1998.
29. Senthilkumar A, Kumar S, Sheagren JN. Increased incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia in hospitalized patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 33:1412-6, 2001.
30. Schmid-Westhausen A, Fehrenbach FJ, Reichart PA. Oral enterobacteriaceae in patients with HIV infection. *J Oral Pathol Med* 19: 229-231, 1990.
31. Sreenivasan P, Gafar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* 29:965-974, 2002.
32. Tanner A, Stillman N. Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens and treatment. *Clin Infec Dis* .16 (4): 304-309, 1993.
33. Torres A.S. *Avaliação do ágar SB20 e MSB na contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva e na placa dental de adolescentes*. [Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP], 1991.
34. Tsang CS, Samaranayake LP. Oral yeasts and coliforms in HIV- infected individuals in Hong Kong. *Mycoses* 43:303-8, 2000.
35. Westergren G, Krasse B. Evaluation of micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 7:82-83, 1978.
36. Yeung SC. HIV infection and periodontal disease. *Ann R Australas Coll Dent Surg* 15:331-334, 2000.

Tabela 1: Média da contagem das colônias (ufc/mL) na saliva de 56 portadores do HIV antes e após o uso de Periogard® e Cepacol®.

<i>Microorganismo</i>	PERIOGARD®		CEPACOL®	
	<i>Contagens – ufc/mL (média)</i>		<i>Contagens – ufc/mL (média)</i>	
	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS
EGM	$9,0 \times 10^5$	0,0	$20,0 \times 10^5$	0,0
ESTAFILOCOCOS	$7,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^1$	$11,7 \times 10^5$	$4,6 \times 10^1$
BGN	$5,7 \times 10^5$	$3,9 \times 10^1$	$4,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$
LEVEDURAS	$2,3 \times 10^2$	$6,8 \times 10^0$	$3,5 \times 10^2$	$3,4 \times 10^1$

Legenda: ufc – unidades formadoras de colônias, EGM – estreptococos do grupo mutans,

BGN – bastonetes Gram negativos

Tabela 2: Variação da concentração inibitória mínima (CIM) dos microrganismos isolados da saliva de 56 portadores do HIV frente ao Periogard® e Cepacol®.

<i>Microorganismos</i>	n	PERIOGARD®	CEPACOL®
		(0,06 µg/mLCHX -	(0,05 µg/mLCCP -
		ponto crítico)	ponto crítico)
EGM	29	0,06-0,48	0,05 – 0,2
ESTAFILOCOCOS	42	0,0002344-0,0009375	0,003125 – 0,1
BGN	43	0,001875-0,12	0,0125 – 0,2*
LEVEDURAS	54	0,0075 -0,06	0,003125-0,025

Legenda: EGM – estreptococos do grupo mutans, BGN – bastonetes Gram negativos, *63,7% das cepas foram inibidas, CHX- clorexidina, CCP – cloreto de cetilpiridínio.

4.1.2 Efeito do uso de anti-sépticos na redução de leveduras na saliva de adultos portadores do HIV

Artigo a ser submetido a revista Panamericana de Salud Publica.

Efeito do uso de anti-sépticos na redução de leveduras na saliva de portadores do vírus da imunodeficiência humana

Cristyane Gonçalves Benicio Bastos Rocha*, Cleômenes Reis**, Maria do Rosário

Rodrigues Silva**, Karla Carvalho Miranda *, Fabiana Cristina Pimenta**

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública/Universidade Federal de Goiás

Rua Delenda Rezende Melo, S/N CEP74605-050 Goiânia, Goiás, Brasil

Resumo

Candida albicans é membro da microbiota autóctone humana de pele e mucosas e está associada a infecções fúngicas invasivas, sendo o principal agente da candidíase bucal em aproximadamente 90% dos pacientes infectados pelo HIV. O objetivo deste estudo foi verificar a ação de anti-sépticos bucais na quantidade de leveduras obtidas da saliva de 56 indivíduos infectados pelo HIV, atendidos no HDT, Goiânia-Goiás. Foram coletadas em duas ocasiões amostras de saliva não estimulada de cada paciente. A primeira coleta foi realizada antes de qualquer intervenção e a segunda após instruções e práticas de higiene bucal e bochecho com Periogard® ou Cepacol®. Alíquotas de 50µL de cada suspensão de saliva foram semeadas em ágar Sabouraud e incubadas a temperatura ambiente por 48 horas. Após o período de incubação, as leveduras foram identificadas através de testes bioquímicos. Leveduras do gênero *Candida* foram isoladas de 54 (96,4%) indivíduos e as contagens variaram de 40 a 1080 ufc/mL de saliva e a identificação destas leveduras mostrou *Candida albicans* (77,8%) como a mais comum, seguida da *Candida parapsilosis* (18,5%) e *Candida glabrata* (3,7%). A suscetibilidade dos isolados ao Periogard® e Cepacol® foi determinada pelo método de diluição em ágar. As leveduras mostraram-se sensíveis aos dois anti-sépticos. A

concentração inibitória mínima (CIM) variou de 0,00375 a 0,06µg/mL para o Periogard® e de 0,003125 a 0,025µg/mL para o Cepacol®, mostrando que houve atividade positiva das duas substâncias utilizadas.

Palavras-chave: leveduras, saliva, anti-sépticos, portadores do HIV

Parte do trabalho de dissertação de Mestrado realizado no HDT/ IPTSP/UFG – Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia.

* Mestrandas em Microbiologia, Programa de Mestrado em Medicina Tropical

** Professores Doutores do DMIPP/IPTSP/UFG.

Introdução

O número de infecções fúngicas tem aumentado nos últimos anos, em função do aumento do uso de antibióticos que desequilibra a microbiota residente, de drogas imunossupressoras e de procedimentos médico-cirúrgicos invasivos. O aumento do tempo de sobrevivência dos pacientes com doenças imunodebilitantes resulta no aumento da população de pacientes com predisposição significativa para desenvolver candidíase disseminada. A partir do evento da AIDS, surgiu uma nova população de pacientes que têm sido mais frequentemente colonizado ou infectado por *Candida* spp (1).

A *Candida albicans* é considerada o principal agente da candidíase bucal, que ocorre em mais de 90,0% dos indivíduos HIV positivos (21). Recentemente vários estudos têm relatado mudanças na microbiota bucal de *Candida* em HIV positivos, em particular um aumento da emergência de *Candida* não *albicans*, associada à terapia para infecção fúngica (20). Esta mudança tem sido particularmente associada a agentes

antifúngicos como o fluconazol. A eficácia deste triazol na prevenção e tratamento da candidose orofaríngea, assim como a sua menor toxicidade, tornaram-no antifúngico de eleição nessas infecções (11). Nas recidivas pode se verificar o aparecimento de isolados de *C. albicans* com suscetibilidade diminuída ao fluconazol, *in vivo* e *in vitro*; a substituição de uma cepa de *C. albicans* sensível por outra resistente; e, ainda, a substituição de *C. albicans* por espécies não-*albicans* (2, 6, 28).

O equilíbrio da microbiota bucal pode ser alterado na imunossupressão pelo HIV, resultando na emergência de microrganismos autóctones oportunistas, entre eles destaca-se *C. albicans* e outras espécies como a *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. lusitaniae* que também têm sido associadas a infecções fúngicas (2). Assim, este fungo deixa a sua condição de saprófita e passa, ocasionalmente, a desencadear uma infecção (3).

O objetivo deste estudo foi detectar e avaliar *in vivo* a quantidade de leveduras na saliva de adultos portadores do HIV após o uso de dois anti-sépticos contendo 0,12% de clorexidina (Periogard[®]) e 0,05% cloreto de cetilpiridínio (Cepacol[®]). Além disso, foi determinada a concentração inibitória mínima das leveduras isoladas, frente aos anti-sépticos contendo 0,12% de clorexidina (Periogard[®]) e 0,05% de cloreto de cetilpiridínio (Cepacol[®]).

Materiais e métodos

Foram estudados cinquenta e seis indivíduos portadores do HIV, atendidos no Consultório Odontológico do Hospital de Doença Tropical (HDT) Goiânia, Goiás, no período de agosto a dezembro de 2003. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética

(HDT) e os pacientes orientados sobre a pesquisa e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Uma ficha de anamnese foi preenchida pela pesquisadora a fim de se caracterizar melhor os indivíduos.

Amostras de saliva não estimulada foram coletadas em tubos esterilizados em duas ocasiões diferentes. A primeira coleta de saliva foi realizada antes de qualquer intervenção do profissional e a segunda foi realizada após instruções de higiene bucal, realização de escovação supervisionada, uso de fio dental e bochecho por um minuto com Periogard[®] ou Cepacol[®]. A escolha dos anti-sépticos para cada paciente foi ao acaso.

As amostras foram transportadas em caixas de isopor sem gelo para o Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. A saliva foi homogeneizada, em vortex, por um minuto e submetida a uma diluição decimal seriada em tampão fosfato de sódio (PBS) e 50µL semeados, pela técnica de gota (4) em ágar Sabouraud para a detecção de leveduras (5).

A caracterização macroscópica e contagem das unidades formadoras de colônias (ufc) foram realizadas sob luz refletida com o auxílio de um microscópio estereoscópico. As leveduras isoladas foram identificadas segundo Kurtzman & Fell (1998) através da formação de tubo germinativo em soro fetal bovino, produção de clamidoconídio em ágar Corn meal e provas bioquímicas como assimilação de hidratos de carbono (5).

Os microrganismos isolados também foram submetidos ao teste de suscetibilidade *in vitro* aos anti-sépticos: Periogard[®] (Colgate-Palmolive Ltda, São Paulo) com gluconato de clorexidina a 0,12% e Cepacol[®] (Merrel Lepetit Farmacêutica

e Industrial Ltda, São Paulo) contendo 0,5mg de cloreto de cetilpiridínio. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de diluição em ágar, recomendada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (6).

Foi aplicado o teste *t* de *Student* para comparações pareadas ao nível de significância (α) de 5,0% para comparar a contagem de ufc antes e depois do bochecho com Periogard® e Cepacol®. A escolha do anti-séptico para cada indivíduo foi ao acaso. A contagem antes do bochecho para os dois grupos, utilizando o teste *t* para observações independentes foi realizada com o intuito de se diminuir os possíveis vieses do estudo.

Resultados

Os cinquenta e seis adultos apresentavam idades entre 19 a 57 (37,3 +/- 8,2) anos, sendo 17 gênero feminino (30,4%) e 39 (69,6%) masculino, 49 (87,5%) estavam fazendo acompanhamento ambulatorial com médicos infectologistas do HDT e 07 (12,5%) eram pacientes do leito dia e apresentavam doença oportunística. Trinta e um (55,4%) não estavam usando medicamentos e 25 (44,6%) estavam fazendo terapia com anti-retrovirais e utilizando algum antimicrobiano. Os antimicrobianos mais usados eram: amoxicilina, azitromicina e sulfametoxazol e trimetoprim. O tempo de diagnóstico da doença variou de 2 meses a 14 anos (média de 4 anos e 3 meses).

Os indivíduos apresentavam baixa frequência de escovação, higienização precária; a maioria não usava fio dental 35 (62,5%) e 46 (82,1%) não utilizavam enxaguatórios bucais; e apenas 4 (7,1%) eram portadores de prótese total.

Um total de 54 leveduras foram isoladas dos 56 adultos portadores do HIV. Dessas 54 leveduras, 42 (77,8%) foram identificadas como *C. albicans*, 10 (18,5%)

como *C. parapsilosis* e 2 (3,7%) como *C. glabrata*. Cinquenta e quatro foram isoladas antes e oito depois do bochecho (Tabela 1).

A tabela 1 apresenta a distribuição das espécies de leveduras na saliva de adultos portadores do HIV antes e após o bochecho com anti-sépticos.

As contagens das leveduras antes da realização dos bochechos variaram de 40 a 1080 ufc/mL. Após a realização da higiene bucal supervisionada com escovação, uso de fio dental e bochechos as contagens variaram de 0 a 80 ufc/mL para o Periogard® e de 0 a 380 ufc/mL para o Cepacol®.

Com a aplicação do teste *t* de *Student* * pareado para o grupo do Periogard® verificou-se a redução significativa ($p < 0,05$) da carga microbiana. O Cepacol® reduziu o número de leveduras, pois houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as contagens antes e após o bochecho com a substância. Através da análise utilizando o teste *t* para observações independentes, as contagens de ufc/mL do pré-bochecho para os dois grupos foram similares. Na análise das contagens de ufc/mL do pós bochecho pôde-se verificar que não houve diferença significativa entre as contagens, pois ambos se mostraram eficazes reduzindo a carga microbiana.

As 54 leveduras identificadas foram submetidas ao teste de suscetibilidade “in vitro” ao Periogard® e Cepacol®. Com relação ao perfil de suscetibilidade ao Periogard® (tabela 2), 30 (55,6%) apresentaram uma concentração inibitória mínima de 0,015µg/mL. O Cepacol® foi capaz de inibir 34 (63,0%) isolados de leveduras a uma CIM de 0,003125µg/mL, mas para a inibição de 100,0% das leveduras, necessitou-se de 0,025µg/mL (tabela 3).

Discussão

Várias espécies de *Candida* estão implicadas na candidíase. A candidíase representa um problema importante no hospedeiro imunocomprometido. A prevalência

da colonização orofaríngea e infecção pela *C. albicans* tem sido avaliada mundialmente (7,8,9). Em concordância com os dados destes autores, neste estudo, *C. albicans* continua sendo o principal microrganismo isolado.

A observação de espécies de *Candida* não *albicans*, como observada neste estudo, em que se verificou o isolamento das espécies *C. parapsilosis* e *C. glabrata* tem sido também observada por diferentes pesquisadores que relataram a emergência de *C. não albicans* (10,11,12).

Em um estudo realizado por Silva e colaboradores (13), foram coletadas 86 amostras da mucosa oral de pacientes com aids em que observaram 59 (68,6%) positivas para o gênero *Candida*; 52 (88,1%) de *C. albicans*, 4 (6,7%) de *C. tropicalis* e 3 (5,1%) de *C. krusei*. Sullivan e colaboradores (1997) investigaram a presença, distribuição, sorotipo e suscetibilidade a antifúngicos de *Candida* spp isolada da boca de 130 pacientes com AIDS (14). Os indivíduos pertenciam a seis centros universitários brasileiros. Os autores concluíram que os portadores estavam infectados principalmente por *C. albicans*, sorotipo A, com a maioria suscetível a todas os antifúngicos utilizados (derivados azólicos). Os dados deste estudo mostram um aumento do número de isolados não *albicans* (22,2%).

O uso de vários medicamentos como agentes anti-retrovirais, antibióticos e agentes antifúngicos têm sido apontado como razões para a emergência de *C. não albicans* (15). *Candida não albicans* tem sido associada com sintomas graves de candidíase oral e tem tido um importante impacto na clínica médica (16).

A aderência às células epiteliais é um passo crítico para o sucesso da colonização e infecção pela *C. albicans* (17). O propósito do emprego de substâncias antimicrobianas consiste na prevenção ou redução da aderência primária e/ou subsequente coadesão de colonizadores tardios (18). As substâncias químicas

antimicrobianas estão indicadas para aqueles que tem dificuldade em manter uma adequada higiene bucal através do controle mecânico.

Neste estudo, o percentual de redução das contagens das unidades formadoras de colônia por mL de saliva das leveduras antes de após o bochecho com Periogard® e Cepacol® foi maior que 90% para ambos enxaguatórios usados, com uma redução de 97,1% e 90,3% respectivamente.

Leveduras do gênero *Candida* são a quarta causa mais comum de infecções da corrente sanguínea em hospitalizados (19). A *Candida parapsilosis* é uma importante não *albicans* que particularmente afeta criticamente neonatos e pacientes de cuidados intensivos, devido a sua associação com nutrição parenteral e acesso venoso central (20). *C. parapsilosis* é altamente responsável por surtos em hospitais, e a sua presença nas mãos dos profissionais de saúde pode ser a fonte predominante do ambiente (21). Esse estudo observou a predominância da *C. parapsilosis*. Análises futuras dos mecanismos de virulência são necessários para se compreender os surtos por este germe, assim como a sua inter-relação com o organismo, hospedeiro e ambiente.

Concluindo, apesar de que *C. albicans* continua sendo o principal isolado no hospedeiro imunocomprometido, nesse estudo verificou-se uma emergência de *Candida* não *albicans* nos isolados de saliva de pacientes infectados por HIV. Os enxaguatórios bucais testados são ativos nas formulações disponíveis comercialmente contra as leveduras do gênero *Candida*, podendo ser empregados no controle da colonização e infecção por estes microrganismos. Portanto esses resultados sugerem que os enxaguatórios contendo agentes antimicrobianos podem representar uma alternativa

apropriada para o manejo do controle dos níveis de *Candida*, contribuindo para a manutenção da saúde bucal.

Referências bibliográficas

1. Holzman DC. NHI grant for *Candida* and AIDS research. *Mol Med Today* 1995;7:300.
2. Pichová I, Pavlicková L, Dostal J, Dolejsi E, Hrusková-Heidingsfeldová O, Weber J, Ruml T, Soucek M. Secret aspartic proteases of *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* and *Candida lusitanae*. Inhibition with peptidomimetic inhibitors. *Eur J Biochem* 2001; 268: 2669-2677.
3. Chimenos E & Lopez PD. Fármacos antifúngicos utilizados em el tratamiento de la micosis. *Medicina Oral* 1998; 3:78-90.
4. Westergren G, Krasse B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 1978 7:82-83.
5. Kurtzman CP, Fell JW. *The yeast, a taxonomic study*. Fourth edition,1998 Elsevier.
6. NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards 2004. In: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria. That Grow Aerobically; Ferraro, MJ.
7. Arribas JR, Hernandez-Albujar S, Gozalez-Garcia JJ, Pena JM, Gonzales A, Canedo T, Madero R, Vasquez JJ, Powderly WG 2000. Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related oropharyngeal candidiasis. *AIDS* 2000; 4:979-985.

8. Cassone A, De Bernardis F, Torosantucci A, Tacconelli E, Tumbarello M, Cauda R. In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *J Infect Dis* 1999; 180:448-53.
9. Diz DP, Ocampo A, Otero I, Iglesias I, Martinez C. Changes in oropharyngeal colonization and infection by *Candida albicans* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2001; 183:355-356.
10. Dronda F, Alonso-Sanz M, Laguna F, Chaves F, Martinez-Suarez JV, Rodrigues-Tudela JL et al. Mixed oropharyngeal candidiasis due to *Candida albicans* and non *albicans Candida* strains in HIV-infected patients. *Eur J Clin Microbiol & Infect Dis* 1996 ;15:446-452.
11. Fidel PL, Vasquez JrJA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clonical disease with comparison to C. Albicans. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:80-96.
12. Nguyen MH, Peacock JEJr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL 1996. The changing face of candidemia: emergence of non *Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 1996; 100:617-623.
13. Silva MRR, Paula CR, Silva SC, Costa TR, Costa MR. Drug resistance of yeasts isolated from oropharyngeal candidiasis in aids patients. *Rev Microbiol* 1998; 29: 271-275.
14. Sullivan D, Haynes K, Bille J, Boerlin P, Rodero L, Lloyd S et al. Widespread geographic distribution of oral *Candida dubliniensis* strains in human immunodeficiency virus-infected individuals. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 960-964.
15. Canuto MM., Rodero FG, Durcasse VOT, Gonzalez CM, Hortelano CME, Rufete AM et al. Epidemiology of yeast colonization and oropharyngeal

- infection other than *Candida albicans* in patients with HIV infection. *Med. Clin* 1999; 112:211-214.
16. Redding SW, Kirkpatrick WR, Dib O, Fothergill AW, Rinaldi MG, Patterson TF. the epidemiology of non-albicans *Candida* in oropharyngeal candidiasis in HIV patients. *Spec care Dentist* 2000; 20:178-81.
 17. Pizzo G, Giuliana MD. Effect of antimicrobial mouthrinses on the in vitro adhesion of *candida albicans* to human buccal epithelial cells. *Clin Oral inestig* 2001; 5:172-6.
 18. Cury JA. Controle químico da placa dental. In: Kringer, L. (Coord) *ABOPREV- Promoção de saúde bucal*. São Paulo: Artes Médicas; 1997: 255-281.
 19. Sant'Ana PL, Milan EP, Marinez R, Telles FQ, Ferreira MS, Alcântara AP et al. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:253-257.
 20. Weems JJ Jr, Chamberland ME, Ward J, Willy M, Padhye AA, Solomon SL. *Candida parapsilosis* fungemia associated with parenteral nutrition and contaminated blood pressure transducers. *J Clin Microbiol*. 1987;25:1029–1032.
 21. Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun* 2002;70:887–98

Tabela 1- Distribuição de 54 leveduras na saliva de portadores do HIV antes e após o bochecho com Periogard® e com Cepacol®

Espécies	Antes do bochecho	Após o bochecho com Periogard®	Após o bochecho com Cepacol®
	(n)	(n)	(n)
<i>Candida albicans</i>	42 (77,8%)	3	5
<i>Candida parapsilosis</i>	10 (18,5%)	0	0
<i>Candida glabrata</i>	2 (3,7%)	0	0

Tabela 2- Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 54 isolados de leveduras do gênero *Candida* obtidas da saliva de portadores de HIV frente ao Periogard® usando a técnica de diluição em ágar.

CIM µg/mL	Cepas inibidas		Cumulativo	
	Nº	%	Nº	%
0,0075	9	16,7	9	16,7
0,015	30	55,6	39	72,3
0,03	5	9,2	44	81,5
0,06	10	18,5	54	100,0

Tabela 3- Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 54 isolados de leveduras do gênero *Candida* obtidas da saliva de portadores de HIV frente ao Cepacol®

CIM μg/mL	Cepas inibidas		Cumulativo	
	Nº	%	Nº	%
0,003125	34	63,0	34	63,0
0,00625	5	9,2	39	72,2
0,0125	8	14,8	47	87,0
0,025	7	13,0	54	100,0

4.1.3 Emergência de estafilococos e bastonetes Gram negativos resistentes a antimicrobianos isolados da saliva de adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana.

Este artigo será submetido a Revista Panamericana de Salud Publica.

Emergência de estafilococos e bastonetes Gram negativos resistentes a antimicrobianos isolados da saliva de adultos portadores do vírus da imunodeficiência humana.

Cristyane Gonçalves Benicio Bastos Rocha*, Cleomenes Reis**, Juliana Lamaro Cardoso *, Fabiana Cristina Pimenta**.

Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública /Universidade Federal de Goiás

Rua Delenda Rezende Melo, s/nº CEP-74605-050 Goiânia, Goiás, Brasil

Resumo

Estafilococos e os BGN fazem parte da microbiota autóctone de inúmeros sítios de animais e seres humanos, estando presentes na boca e saliva e, em situações de imunossupressão podem causar infecções bucais ou sistêmicas. Este estudo objetivou detectar o perfil de suscetibilidade de estafilococos e BGN da saliva de 56 indivíduos HIV positivos. Foram coletadas duas amostras de saliva não estimulada de cada paciente. A primeira foi realizada antes de qualquer intervenção e a segunda após instruções e práticas de higiene bucal e bochecho com Periogard® ou Cepacol®. Aliquotas de 50µL de cada suspensão foram semeadas em ágar manitol e ágar MacConkey. *Staphylococcus* spp foram isolados de 75,0% dos pacientes e 80,9% desses eram *S. aureus* e 19,0% estafilococos coagulase negativos. *Enterobacter cloacae* foram isolados de 60,7% dos pacientes e 20,9% apresentaram *Pseudomonas aeruginosa*. A CIM para os estafilococos variou de 0,0002344-0,0009375µg/mL para o Periogard®, 0,003125-0,1µg/mL para o Cepacol®; BGN de 0,001875-0,12µg/mL para o Periogard®, 0,0125-0,2µg/mL para o Cepacol®. A CIM para os estafilococos variou de 6-96µg/mL

para a amoxicilina; 8-64 μ g/mL para azitromicina e 40-1280 μ g/mL para o sulfametoxazol-trimetoprim; BGN variou de 12-768 μ g/mL para a amoxicilina; 3-96 μ g/mL para azitromicina e 10-1280 μ g/mL para o sulfametoxazol-trimetoprim. Das 42 cepas de *Staphylococcus sp*, 14 apresentaram resistência a oxacilina. Quanto a penicilinase, 30 produziram a enzima. Observou-se a emergência de microrganismos resistentes às drogas de uso profilático em uma proporção elevada, o que merece uma atenção dos clínicos responsáveis, bem como do cirurgião-dentista que poderá utilizar o controle químico por meio de anti-sépticos para reduzir estes potenciais patogênicos.

Palavras-chave: estafilococos, bastonetes Gram negativos, anti-sépticos, saliva, portadores do HIV, resistência microbiana.

Trabalho de dissertação de Mestrado realizado no HDT/ IPTSP/UFG – Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia.

* Mestrandas em Microbiologia, Programa de Mestrado em Medicina Tropical.

** Professores Doutores do DMIPP/IPTSP/UFG.

Introdução

Dentre os vários microrganismos que causam infecções em pacientes infectados pelo HIV, *Staphylococcus aureus* é responsável por uma considerável morbidade e mortalidade e representa o agente mais comumente isolado dos casos de bacteremias desses pacientes (1). Várias alterações imunológicas relacionadas ao HIV e fatores de risco epidemiológicos predisõem os pacientes com AIDS à bacteremia. Foi relatado um efeito favorável da terapia anti-retroviral (ARV) na redução da incidência de bacteremia e outras doenças oportunistas em indivíduos infectados pelo HIV (2).

Um estudo de vigilância de infecções da corrente sanguínea foi conduzido em um hospital no nordeste da Tailândia entre 1989 e 1998. A incidência de bacteremias causadas por *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Enterobacter* sp e *Pseudomonas aeruginosa* foi constante (3). Observou-se pacientes com AIDS albergando *S. aureus* em suas narinas e, ainda, verificou-se a emergência desse germe associada ao uso de antibiótico, particularmente ao sulfametoxazol-trimetoprim (4).

Indivíduos infectados pelo HIV, especialmente aqueles com história de uso de drogas injetáveis, estão sob alto risco de infecção por *S. aureus*. O uso de agentes antimicrobianos para infecções oportunistas pode aumentar a colonização nasal por *S. aureus* multi-resistentes nessa população e, conseqüentemente, a sua disseminação para a comunidade (5).

Espécies de *Enterobacter* estão emergindo como importantes patógenos humanos, particularmente entre os pacientes hospitalizados (6). *E. cloacae* e *E. agglomerans* são os mais frequentemente isolados dos pacientes com infecções nosocomiais (7).

Moreira et al. (8) detectaram a presença de enterobactérias na saliva de acadêmicos de medicina. Foram identificadas na saliva de 109 acadêmicos, 60 enterobactérias com a predominância 34 (75,5%) de *Enterobacter agglomerans*. As contagens variaram de 97,1 a 383,3 ufc/mL, o que representa um achado incomum, pois as enterobactérias são causa comum de infecção hospitalar em imunocomprometidos, além do fato de serem quase sempre resistentes a múltiplos antibióticos.

Pesquisadores em Hong Kong (9) determinaram o perfil e a presença de leveduras e coliformes isolados da cavidade bucal de pacientes HIV positivos. Os isolados mais comuns foram *C. albicans* e *Enterobacter cloacae*.

Em estudo prospectivo das infecções nosocomiais em pacientes com HIV (10), observaram que os agentes etiológicos mais comuns foram: *S. aureus* (27,6%), *P. aeruginosa* (13,8%), e *E. cloacae* (13,8%).

Diante do exposto este estudo objetivou determinar o perfil de suscetibilidade dos estafilococos e bactérias Gram negativas isoladas da saliva de adultos portadores do HIV.

Material e Métodos

Foram estudados cinquenta e seis indivíduos portadores do HIV atendidos no Consultório Odontológico do Hospital de Doenças Tropicais/Anuar Auad Goiânia, Goiás, no período de agosto a dezembro de 2003. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética (HDT) e os pacientes orientados sobre a pesquisa e, aqueles que concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram coletadas, em tubos esterilizados, duas amostras de saliva não estimulada (2,0mL) de cada paciente. A primeira coleta de saliva foi realizada antes de qualquer intervenção do profissional. A segunda foi realizada após instruções de higiene bucal, realização de escovação supervisionada, uso de fio dental e bochecho por um minuto com Periogard® ou Cepacol®.

As amostras foram transportadas em caixas de isopor sem gelo para o Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. A saliva foi homogeneizada, em vortex, por um minuto e submetida a uma diluição

decimal seriada em tampão fosfato de sódio (PBS) e 50µL semeadas, pela técnica de gota (11) em ágar manitol (estafilococos); ágar MacConkey (bactérias Gram negativas) (12).

A caracterização macroscópica e contagem das unidades formadoras de colônias (ufc) foram realizadas sob luz refletida com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Posteriormente foram realizadas provas bioquímicas para identificação das espécies isoladas. Para a identificação de estafilococos as provas realizadas foram: catalase e coagulase, enquanto que para a identificação das enterobactérias realizou-se: inoculação em ágar tríplice açúcar ferro (TAF), produção de gás, produção de sulfeto de hidrogênio, utilização do citrato, produção de urease, produção de fenilalanina desaminase, prova do vermelho de metila, produção de indol, motilidade, fermentação da glicose, lactose, sacarose e manitol (11).

Staphylococcus sp foram submetidos ao teste de suscetibilidade ao antimicrobiano oxacilina, segundo Chambers (13) e quanto a produção de penicilinase, segundo Haight e Finland (14).

Os microrganismos isolados também foram submetidos ao teste de suscetibilidade ao Cepacol® e Periogard® e a três antibióticos: amoxicilina, azitromicina e sulfametoazol-trimetoprim. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de diluição em ágar, recomendada pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (15).

Resultados

Os cinquenta e seis adultos apresentavam idades entre 19 a 57 (37,3 +/- 8,2) anos, sendo 17 gênero feminino (30,4%) e 39 (69,6%) masculino, 49 (87,5%) estavam

fazendo acompanhamento ambulatorial com médicos infectologistas do HDT e 07 (12,5%) eram pacientes do leito dia e apresentavam doença oportunística. Trinta e um (55,4%) não estavam usando medicamentos e 25 (44,6%) estavam fazendo terapia com anti-retrovirais e utilizando antimicrobiano. Os antimicrobianos mais usados eram: amoxicilina, azitromicina e sulfametoxazol e trimetoprim. O tempo de diagnóstico da doença variou de 2 meses a 14 anos (média de 4 anos e 3 meses).

Os indivíduos apresentavam baixa frequência de escovação, higienização precária; a maioria não usava fio dental 35 (62,5%) e 46 (82,1%) não utilizavam enxaguatórios bucais; e apenas 4 (7,1%) eram portadores de prótese total.

Foram isolados em 42 (75,0%) dos 56 pacientes, estafilococos, sendo 80,9% (34) *S. aureus* e 19,0% (8) estafilocos coagulase negativos. Os bastonetes Gram negativos foram isolados em 43 pacientes (76,8%), sendo que 34 (79,1%) foram identificadas como *Enterobacter cloacae* e 9 (20,9%) como *Pseudomonas aeruginosa*.

A tabela 1 representa a distribuição dos microrganismos isolados da saliva dos portadores do HIV antes e após o uso de anti-sépticos.

Das 42 amostras de estafilococos, 34 de *S. aureus* foram isoladas antes, sendo que uma continuou sendo isolada após bochecho com Periogard[®] e quatro com o Cepacol[®]. Apenas uma das oito amostras de estafilococo coagulase negativo foi isolada após o bochecho com Cepacol[®]. Quanto as bactérias Gram negativas, 34 *Enterobacter cloacae* foram isolados antes e destas 14 continuaram viáveis após o bochecho com Cepacol[®] e sete com o Periogard[®]. Dentre as nove amostras de *P. aeruginosa* isoladas, sete continuaram sendo observadas no cultivo após o bochecho com Cepacol[®].

Foram analisadas 42 *Staphylococcus* spp, destas, 14 (33,3%) apresentaram resistência a oxacilina e 28 (66,7%) sensibilidade a essa droga. Com relação a penicilinase, 30 (74,4%) produziram a enzima e 12 (28,6%) não a produziram.

A tabela 2 apresenta o perfil de suscetibilidade (CIM) dos estafilococos e bastonetes Gram negativos isolados frente aos anti-sépticos.

Com relação ao perfil de suscetibilidade dos isolados aos anti-sépticos, a concentração de clorexidina presente em 1mL de Periogard® (0,06µg) foi capaz de inibir os estafilococos. O Cepacol® inibiu a maioria dos estafilococos, apesar de ter inibido 63,7% dos BGN quando a sua concentração de 0,05mg contida em 1 mL da solução foi multiplicada em quatro vezes.

A tabela 3 mostra a CIM dos antibióticos para os estafilococos e bastonetes Gram negativos. A faixa de atividade antimicrobiana da amoxicilina variou de 6 a 96µg/mL para os estafilococos e de 12-768µg/mL para os bastonetes Gram negativos. A azitromicina inibiu isolados de estafilococos desde a concentração de 8µg/mL até 64µg/mL, enquanto os isolados de bastonetes Gram negativos foram inibidas de 3µg/mL a 96µg/mL. O SMT-TM apresenta a concentração sérica de 40µg/mL-80µg/mL de acordo com as especificações do medicamento. O SMT-TM apresentou uma faixa ampla de inibição que variou de 40-1280µg/mL para os estafilococos e 10-1280µg/mL para BGN.

Discussão

A elevada colonização dos estafilococos e bastonetes Gram negativos observada nesse estudo, é fonte potencial para desencadear infecções sistêmicas e oportunistas em indivíduos imunocomprometidos. Tal resultado sustenta a observação de episódios de

bacteremia por 1000 pacientes hospitalizados onde se detectou que a incidência era maior (13,2) entre os HIV positivos quando comparado com (0,8) os HIV negativos (1)

Estafilococos coagulase negativos são encontrados em 63% nas narinas e boca. Embora, tenham sido considerados como microrganismos de pouca importância clínica por muitos anos, atualmente estão associados a várias infecções, como as infecções urinárias, endocardites, infecções de válvulas cardíacas, osteomielites, endoftalmites e infecções nosocomiais (16).

Foi observado em um estudo que espécies de *Enterobacter* podem constituir patógenos potenciais em pacientes com HIV, especialmente aqueles com baixa contagem de linfócito T CD4, leucopenia-neutropenia e que estejam hospitalizados. Um outro dado interessante desse trabalho é que a infecção por *Enterobacter* spp adquirida no hospital é mais freqüente que a adquirida na comunidade (17). Nossos resultados apontam uma alta colonização de *Enterobacter cloacae* nos indivíduos portadores do HIV da comunidade, fato curioso, uma vez que estes pacientes apresentam história de pelo menos uma internação durante o curso da doença.

O Periogard® mostrou uma melhor atividade, principalmente contra os estafilococos. O Cepacol® apresentou uma ação inibitória satisfatória contra os estafilococos, porém não foi muito eficaz para a redução das enterobactérias.

O uso de agentes antimicrobianos para profilaxia de doenças oportunistas nestes pacientes é bastante difundido. Algumas das manifestações oportunistas mais freqüentes são: candidíase oral, pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PCP), toxoplasmose cerebral, criptococose, histoplasmose, citomegalovirose, isosporíase e criptosporidíase. Para o tratamento da candidíase, criptococose e histoplasmose utilizam-se agentes antifúngicos como os derivados azólicos e anfotericina B. Para prevenir e tratar a PCP e a isosporíase administra-se o sulfametoxazol-trimetoprim. As doses profiláticas são

baixas e por tempo indeterminado. O uso da azitromicina está relacionado ao tratamento e profilaxia da toxoplasmose cerebral e pneumocistose (18).

O sulfametoxazol-trimetoprim é largamente usado para profilaxia por *Pneumocystis carinii* em pacientes infectados pelo HIV, todavia os efeitos dessa prática na emergência de bactérias resistentes são poucos conhecidos (19).

Os microrganismos isolados neste trabalho apresentaram uma faixa de concentração inibitória mínima acima da concentração sérica dos antimicrobianos testados, o que implica na emergência de cepas resistentes.

Concluindo, a detecção de altas contagens e a emergência de cepas resistentes de *S. aureus* e enterobactérias é um achado preocupante, uma vez que esses microrganismos são fontes potenciais de infecção e, portanto, o uso de anti-sépticos para reduzir essa carga microbiana deve ser avaliado individualmente.

Referências Bibliográficas

1. Senthilkumar A, Kumar S, Sheagren J N. Increased incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia in hospitalized patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2001; 33:1412–1416.
2. Paul S, Gilbert HM, Ziecheck W, Jacobs J, Sepkowitz, KA. The impact of potent antiretroviral therapy on the characteristics of hospitalized patients with HIV infections. *AIDS* 1999; 13: 415–418.
3. Chierakul W, Rajanuwong A, Wuthiekanun V, Teerawattanasook N, Gasiprong M, Simpson A, Chaowagul W, White NJ. The changing pattern of bloodstream infections associated with the rise in HIV prevalence in northeastern Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; 98:678-86.

4. von Eiff C, Lubritz G, Heese C, Peters G, Becker K. Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in AIDS patients on the formation of the small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 48:191-194.
5. Miller M, Cespedes C, Vavagiakis P, Klein RS, Lowy FD. *Staphylococcus aureus* colonization in a community sample of HIV-infected and HIV-uninfected drug users. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2003; 22:463-9.
6. van Nierop WJ, Duse AG, Stewart RG. Molecular epidemiology of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in the neonatal intensive care unit of a provincial hospital in Gauteng, South Africa. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3085-3087.
7. Jalaluddin S, Devaster JM, Scheen R. Molecular epidemiological study of nosocomial *Enterobacter aerogenes* isolates in a Belgium hospital. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1846-1852.
8. Moreira TAC, Benicio CG, Cardoso JL, Cardoso AM, Reis C, Pimenta FC. Isolamento e contagem de bactérias Gram negativas na saliva de acadêmicos de medicina. *BJID* 2003; 7: S97.
9. Tsang CS, Samaranayake LP. Oral yeasts and coliforms in HIV infected individuals in Hong Kong. *Mycoses* 2000; 43:303-8.
10. Frank U, Daschner FD, Schulgen G, Mills J. Incidence and epidemiology of nosocomial infections in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1997; 25:318-20
11. Westergren, G, Krasse, B. Evaluation of a micromethod for determination of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 1978; 7:82-83.

12. Koneman EW, Allen SD, Dowell VRJR, Sommers RS. Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorido. 5ª ed. 2001. São Paulo.
13. Chambers HF. Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 781-791.
14. Haight TH, Finland m 1952. Modified Gots test for penicillinase production. *Am J Clin Pathol* 1952; 22(8):806-808.
15. NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards. In: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria. That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition 2004. Ferraro MJ.
16. Rup ME, Archer GL. Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infec Dis* 1994; 19:231-245.
17. Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Chiodo F. Enterobacter spp. infections complicating the course of HIV disease. *J Chemother* 2001;13:195-201.
18. Andrade JG, Pereira, LIA. Manual prático de doenças transmissíveis. 6ed. Goiânia: IPTSP-UFG, 2003; 84-86.
19. Martin JN, Rose DA, Hadley WK, Perdreau-Remington F, Lam PK, Gerberding JL. Emergence of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in the AIDS era. *J Infect Dis* 1999; 180: 1809-18.

Tabela 1: Isolamento de estafilococos e bastonetes Gram negativos da saliva de adultos portadores do HIV antes e após bochecho com anti-sépticos.

Espécies	Antes do bochecho	Após o bochecho com Periogard®	Após bochecho com Cepacol®
	(n)	(n)	(n)
<i>Staphylococcus aureus</i>	34	1	4
Estafilococos coagulase negativo	8	0	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	34	7	14
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	0	7

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade (CIM) das cepas de estafilococos e bastonetes Gram negativos isolados da saliva de adultos portadores do HIV.

<i>Microrganismos</i>	n	PERIOGARD®	CEPACOL®
		(0,06 µg/mLCHX- ponto crítico)	(0,05 µg/mLCCP – ponto crítico)
ESTAFILOCOCOS	42	0,0002344 -0,0009375	0,003125 – 0,1
Bastonetes Gram	43	0,001875-0,12	0,0125 – 0,2*
Negativos			

Legenda: EGM – estreptococos do grupo mutans, CHX – clorexidina, CCP – cloreto de cetilpiridínio

*63,7% das cepas foram inibidas

Tabela 3: Perfil de suscetibilidade (CIM) das cepas de estafilococos e bastonetes Gram negativos isolados da saliva de adultos portadores do HIV frente a antimicrobianos.

<i>Microrganismos</i>	<i>n</i>	<i>AMOXICILINA</i> <i>(ponto crítico 6 µg/mL)</i>	<i>AZITROMICINA</i> <i>(ponto crítico 8 µg/mL)</i>	<i>SMT-TM</i> <i>(ponto crítico 40 µg/mL)</i>
Estafilococos	42	6-96	8-64	40-1280
Bastonetes	43	12-768	3-96	10-1280
Gram Negativos				

5. Considerações Finais

Uma vez caracterizada a microbiota dos portadores do HIV pode-se atuar com mais conhecimento frente às condições bucais apresentadas. O uso de anti-sépticos associados a uma higienização supervisionada reduz significativamente a carga microbiana destes indivíduos, contribuindo para a biossegurança, pela redução de microrganismos no aerossol, e também para o bem estar e manutenção da saúde bucal destes.

Esses resultados sugerem a proposição de um protocolo para adequação do meio bucal destes indivíduos através de medidas simples e eficazes como as que foram realizadas na metodologia. O simples ato de instruir o paciente a respeito de hábitos de higiene bucal enquanto se faz a escovação e uso do fio dental supervisionados, diante do espelho, aliado a um bochecho com anti-séptico por um minuto, resulta na motivação e comprometimento do paciente pela melhoria da sua saúde.

6. Anexos

Anexo A

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo C – Ficha de Anamnese

Data: ___/___/___	N.: _____
Nome: (iniciais) _____	
Data de nascimento: ___/___/___ Sexo: ___ Estado civil: _____ Profissão: _____	
Naturalidade: _____ Nacionalidade: _____	
1- Como está o paciente? _____	
2- Há quanto tempo é portador? _____	
3- Toma medicamentos? Quais? _____	
4- Já esteve internado (a) alguma vez? Por quê? _____	
5- Já esteve com alguma doença oportunista? _____	
6- Já teve ou tem:	
Sifilis ()S ()N Candidíase ()S ()N Gonorréia ()S ()N Tuberculose ()S ()N	
Herpes Simples ()S ()N Herpes Zoster()S ()N Citomegalovirus ()S ()N	
Papiloma Vírus Humano ()S ()N Hepatite B ()S ()N Hepatite C ()S ()N	
Distúrbios neurológicos? ()S ()N Neoplasias()S ()N Outros: _____	
7- Tem alergia a algum medicamento ou produto? _____	
8- Está com anemia? _____	
9- Escova os dentes todos os dias? _____ Quantas vezes? _____ Usa fio dental? _____	
10- Usa algum enxaguatório bucal? Qual? _____	
Espaço reservado para anotações de resultados de exames (contagem de CD4; carga viral; hemograma, etc) ou parecer médico: _____	

Anexo D

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

A Revista de Patologia Tropical aceita originais de artigos, revisões, resenhas, comunicações, relatos de casos sobre temas de interesse da Patologia Tropical e Saúde Pública.

- Os trabalhos são submetidos aos consultores e só são publicados caso recebam parecer favorável.

Os textos devem ser apresentados preferencialmente em disquete (programa Microsoft Word 8.0 ou conversíveis, assim como tabelas, legendas e equações no menu do programa) ou em duas cópias impressas, espaço duplo, em uma só face do papel.

- Os artigos devem apresentar, sempre que possível, a seguinte estrutura:

- a. título;
- b. autor(es);
- c. endereço para correspondência;
- d. filiação científica (Departamento, Instituto, Faculdade, Universidade);
- e. resumo (com, no máximo, 200 palavras);
- f. unitermos;
- g. introdução;
- h. material e métodos;
- i. resultados;
- j. discussão;
- k. abstract e key words;
- l. agradecimentos;
- m. referências bibliográficas.

As referências bibliográficas devem ser apresentadas em ordem alfabética, com entrada pelo último sobrenome do(s) autor(es). Quando houver mais de um trabalho do mesmo autor citado, deve-se seguir a ordem cronológica das publicações. Exemplos de referências:

a) artigo: Wilson M, Bryan RT, Fried JA, Ware DA, Schantz PM, Pilcher JB, Tsang VCW. Clinical evaluation of the cysticercosis enzyme-linked immunoelectrotransfer

blot in patients with neurocysticercosis. J Infect Dis 164:1007-1009, 1991.

b) tese: Spadeto AL. Eficácia do Benzonidazol no tratamento de crianças com infecção crônica recente pelo *Trypanosoma cruzi* após 6 anos de seguimento: Ensaio clínico aleatório, duplo-cego, placebo controlado. Goiânia [Tese de Mestrado em Medicina Tropical - IPTSP/UFG], 1999.

c) livro: Smith PG, Morrow RH. Ensayos de Campo de Intervenciones en Salud en Países en Desarrollo: Una Caja de Herramientas. OPAS. Washington, 1998.

- As chamadas numéricas devem corresponder ao número estabelecido nas referências bibliográficas.

- Das comunicações científicas não se exige a estrutura comum aos artigos.

- As ilustrações devem apresentar a qualidade necessária para permitir uma boa reprodução gráfica. Elas devem trazer no verso o nome do autor, o número e a legenda respectiva. Devem estar designadas, no texto, como figura (Figura 1, Figura 2 ...)

- Em caso de inserção de fotografias coloridas, as despesas decorrentes do processo de separação de cores caberão aos autores do trabalho.

- Os autores terão direito a cinco separatas de seus trabalhos. Maior número poderá ser solicitado às expensas dos autores.

- Os trabalhos deverão ser enviados para:

Revista de Patologia Tropical Caixa Postal 131 74001-970 - Goiânia - Goiás - Brasil ou pelo E-mail: revista@iptsp.ufg.br

A Revista de Patologia Tropical (ISSN 0301-0436) é uma publicação semestral do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

The Revista de Patologia Tropical (ISSN 0301-0436) is a biannual journal published by Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás.

Rua Delenda Rezende de Melo, S/N- Setor Universitário-Goiânia-GO-CEP 74605-050- Fone:(062) 261-6497-Fax:(062) 202-3066
e-mail: iptsp@iptsp.ufg.br - URL: www.iptsp.ufg.br

Anexo E