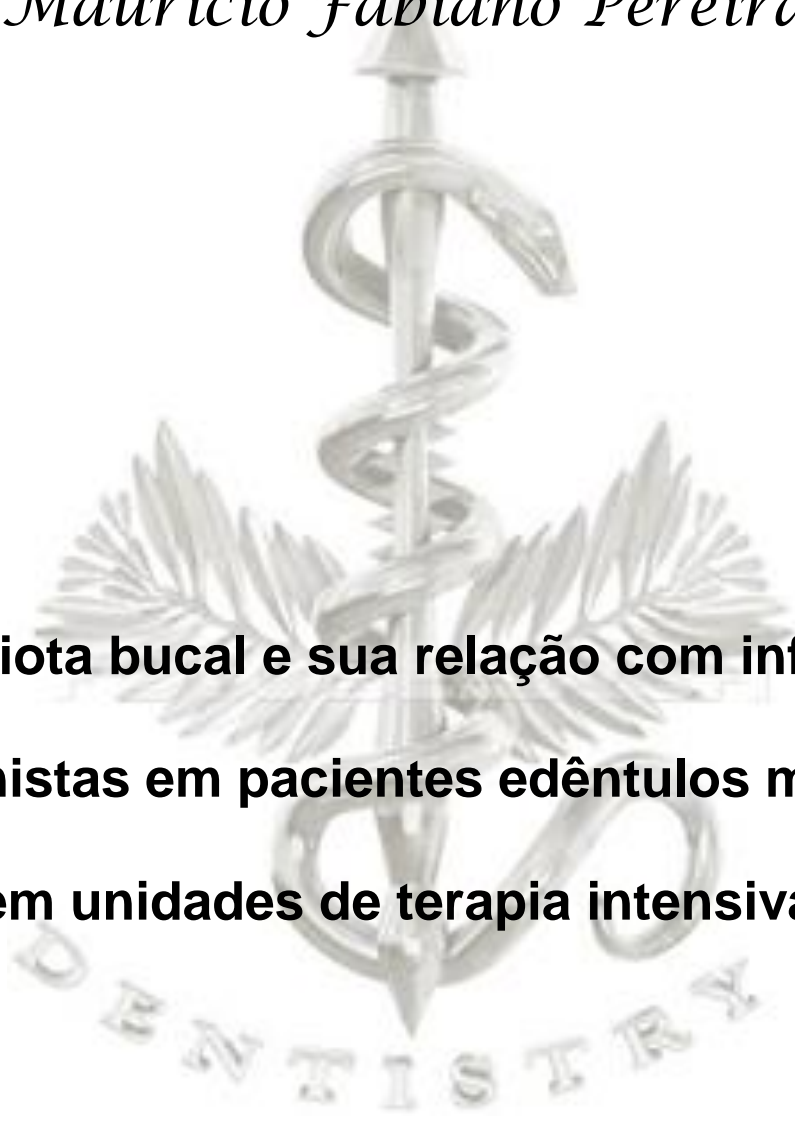


Maurício Fabiano Pereira



**Microbiota bucal e sua relação com infecções
oportunistas em pacientes edêntulos mantidos
em unidades de terapia intensiva.**

Araçatuba - SP

2015

Maurício Fabiano Pereira

**Microbiota bucal e sua relação com infecções
oportunistas em pacientes edêntulos mantidos em
unidades de terapia intensiva.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia
Câmpus de Araçatuba - Unesp para obtenção do
título de “Mestre em Odontologia” – Área de
Concentração em Estomatologia

Orientador: Prof. Titular Elerson Gaetti Jardim Junior

Araçatuba - SP

2015

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

V658d Pereira, Maurício Fabiano.
Microbiota bucal e sua relação com infecções
oportunistas em pacientes edêntulos mantidos em
unidades de terapia intensiva / Maurício Fabiano
Pereira. -
Araçatuba, 2015
72 f.; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientador: Prof. Elerson Gaetti Jardim Júnior

1. Infecções oportunistas 2. Unidades de terapia
Intensiva 3. Biofilme 4. Saúde Bucal I. Título

Black D6
CDD 617.63

Dedicatória



Primeiramente aos meus pais, Mary Helena e Varnei. Eles me amam porque sou seu filho, é um fato inalterável. Nos momentos de sucesso, isso pode parecer irrelevante, mas nas ocasiões de fracasso, isso me oferece um consolo e uma segurança que não se encontram em qualquer outro lugar. “Amo vocês para daqui três vidas ainda”.

A minha família, todos tios, tias, primos, irmão, enfim, todos que me moldaram como sou. Em especial a minha avó, Adelaide, e minha tia/madrinha Dulcinéia. Deus não podia estar em todos os lugares ao mesmo tempo, por isso criou vocês. Quando preciso de uma amiga, teus olhos sensíveis se endurecem; quando preciso de uma lição, tua força e teu amor me guiam pela vida e me dão as asas que preciso para voar.

Dedico por fim, a minha afilhada, Lorena, que descansa com Papai do Céu, e que no pouco tempo que ficou aqui, mesmo na minha ausência justificada, me ensinou a força que a vontade de viver tem, e que esta vontade pode fazer com que uma pessoa, mesmo que pequenina, aguente o peso do mundo como um gigante.

Agradecimentos Especiais



Obrigado Meu Deus pela tua grandeza, pelo seu amor incondicional. Obrigado pelo carinho, pelo cuidado com minha família, por nunca desistir de mim, por me amparar em meus momentos tristes, e por me dar a oportunidade de estar concluindo mais um ciclo em minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Titular Elerson Gaetti Jardim Junior, que mais que conhecimento específico, me ajudou a compreender o que Einstein disse a muito tempo: “A mente que se abre a uma nova ideia, jamais voltará ao seu tamanho original”. Espero que este seja o início de uma amizade duradoura.

À Prof.^a Christiane Marie Schweitzer, que, mesmo sem me conhecer, me ajudou em inúmeros trabalhos, inclusive neste, realizando desde correções, até as análises estatísticas.

Aos colegas de departamento, Prof.^a Ana Cláudia Okamoto, que mais que microbiologia, me ensinou que carinho ainda é algo valioso na vida. Robson, que me mostrou que ser fiel aos amigos e ao seu trabalho é algo fundamental.

E, por fim, em especial aos amigos Nathália Dias, Giseli M. Kayahara, Noelle Kiill e Marcelinho Tamarim. Dentre inúmeras coisas que poderia dizer, digo: Obrigado, amo vocês para sempre.

Agradecimentos



À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP - Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa de sua Diretora, Prof.^a. Dr.^a. Ana Maria Pires Soubhia, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado em Estomatologia.

Aos funcionários de toda a FOA, em especial Dora (cantina), que me cuidou como filho estes anos, Adriana (seção de graduação), Lilian, Cris e Valéria (seção de pós-graduação), Jane, Anne, Janaina, Suzy (COB), que sempre estiveram comigo e me ajudaram a esquecer a saudade de casa, Marli (estomatologia), que dizer que é um anjo seria pouco.

Aos professores do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, em especial aos professores da disciplina de Estomatologia, que enriqueceram meu conhecimento na área. Prof. Daniel, por me instruir e ensinar. Prof. Éder, por me ensinar e divertir. À Prof.^a. Renata, mãe, amiga, e excelente profissional. Prof.^a. Cristiane, patologia viva e pura, e que tenho muito apreço. Prof. Marcelo, eficaz e eficiente, modelo de profissionalismo e respeito aos outros. Prof.^a. Leda, que sempre estava disposta a nos ajudar e que gosto muito.

À Livia Meca, por ter possibilitado, através da coleta das amostras, que este trabalho fosse realizado. O trabalho não seria o mesmo, ou não seria esse trabalho, sem essa colaboração.

À Adriana Sales, amiga, grande profissional, e inspiração de amor e dedicação ao lar e profissão. Obrigado e nossa parceria, espero, será longa.

Minha amiga de mestrado mineira/carioca, Neliana, que dividi angustias, alegrias e conquistas. Espero que continuemos esta amizade (mas em Minas, porque não sou chegado no sol do Rio, rs).

Epígrafe



“Se A é o sucesso, então A é igual a X mais Y mais Z. O trabalho é X; Y é o lazer; e Z é manter a boca fechada... Procure ser um homem de valor, ao invés de um homem de sucesso”

Albert Einstein

Pereira, M. F. **Microbiota bucal e sua relação com infecções oportunistas em pacientes edêntulos mantidos em unidades de terapia intensiva.** [Dissertação]. Araçatuba: UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2015.

Resumo

Introdução: A relação entre a microbiota bucal e infecções graves em pacientes mantidos internados em unidades de terapia intensiva (UTI) vem sendo estabelecida, principalmente para os portadores de próteses totais ou parciais, visto que o biofilme bucal pode se converter em reservatório de microrganismos que não fazem parte dessa microbiota. **Objetivo:** Esse estudo objetivou avaliar a presença dos principais patógenos periodontais e oportunistas na boca de pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva. **Material e Método:** Foram obtidos dados referentes às condições de saúde de 156 pacientes mantidos por mais de 72 horas em ambiente de UTI. Realizou-se exames clínicos intrabucais e coleta de amostras de saliva e mucosas bucais, de secreções respiratórias, sangue e urina. A presença dos principais microrganismos bucais e oportunistas associados às infecções hospitalares foi avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Test T, enquanto a correlação entre as variáveis foi obtida pelo Teste de Spearman, todos ao nível de significância de 5%. **Resultados:** Houve correlação negativa entre a presença de leucócitos e alguns patógenos oportunistas bucais e exógenos. Os microrganismos estudados foram mais prevalentes no gênero masculino e os anaeróbios obrigatórios e microrganismos capnofílicos oriundos do ambiente bucal se mostraram mais relevantes nas infecções sistêmicas do que os patógenos oportunistas exógenos, como as enterobactérias e os pseudomonados. **Conclusão:** Concluiu-se que a fragilidade da saúde bucal de pacientes internados em UTI, por vezes com imunossupressão, associada a colonização e/ou infecção de microrganismos oportunistas, pode ser um fator agravante na deterioração e piora do quadro sistêmico do paciente. **Palavras-chave:** infecções oportunistas, unidades de terapia intensiva, periodontite, biofilme, PCR, saúde bucal.

Pereira, M. F. **Oral microbiota and its relationship with opportunistic infections from edentulous patients in intensive care units.** [dissertation]. Araçatuba: UNESP – São Paulo State University; 2015.

Abstract

Introduction: The relationship between the oral microbiota and serious infections in patients kept in intensive care units (ICU) has been established, mainly for patients with dentures or partials, since oral biofilm can become reservoir of micro-organisms that are not part of this microbiota.

Objective: This study aimed to evaluate the presence of the main periodontal pathogens and infections in the mouth of patients kept in intensive care units. **Material and method:** Data were

obtained on the health conditions of 156 patients held for more than 72 hours in the ICU environment. Intraoral clinical examination was carried out and collection of samples of saliva and oral mucosa, respiratory secretions, blood and urine. The presence of the main oral and opportunistic micro-organisms associated with hospital-acquired infections were evaluated by means of the polymerase chain reaction (PCR). Statistical analysis was performed by Mann-Whitney tests and Test T, while the correlation between the variables was obtained by Spearman test, all at a significance level of 5%.

Results: There was a negative correlation between the presence of leukocytes and some oral opportunistic pathogens and exogenous. The microorganisms studied were more prevalent in male gender and obligate anaerobes and capnofilicos microorganisms from oral cavity were more relevant in systemic infections than the exogenous opportunistic pathogens, such as *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas*.

Conclusion: It was concluded that the fragility of the oral health of patients admitted to ICU, sometimes with immune suppression associated with the colonization and/or infection from opportunistic micro-organisms can be an aggravating factor in the deterioration and worsening of the patient's systemic framework.

Keywords: opportunistic infections, intensive care units, periodontitis, biofilm, PCR, oral health.

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Sequência de oligonucleotídeos dos iniciadores para detecção dos microrganismos estudados.....	68
Tabela 2 - Gênero, idade, diagnóstico clínico e uso de medicações nos pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI).	69
Tabela 3 - Ocorrência dos microrganismos do complexo vermelho de Socransky em pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI) HIV+, não soropositivos e com sepse.....	70
Tabela 4 – Ocorrência de microrganismos exógenos e bucais em pacientes intern.....	71

Lista de Abreviaturas

HIV = Human immunodeficiency vírus

UTI = Unidade de terapia intensiva

AIDS = Acquired immunodeficiency syndrome

DST = Doença sexualmente transmissível

CD4 = Cluster of differentiation ou Grupamento de diferenciação 4 (molécula que se expressa na superfície de células T, macrófagos, monócitos e na célula dendrítica).

T CD4+ = Linfócito T auxiliar com o grupamento de diferenciação ativado

HAART = highly active antiretroviral therapy

PCR = Polimerase Chain Reaction

DNA = ácido desoxirribonucleico

mm = milímetro

ml: = mililitro

min: = minuto

s = segundo

µl:= microlitro

mM = mili molar

Sumário

1 Introdução.....	17
2 Proposição.....	21
3 Materiais e Métodos.....	23
3.1 Pacientes com Infecções Graves e/ou Quadros septicêmicos.....	23
3.2 Exame clínico bucal.....	24
3.3 Coletas dos espécimes clínicos: saliva, mucosas, urina, sangue e secreções respiratórias.....	25
3.4 Extração do DNA microbiano	26
3.5 Detecção dos principais microrganismos alvo por PCR.....	26
3.6 Análise Estatística.....	27
4 Resultados.....	29
4.1 Condições do paciente.....	29
4.2 Uso de antimicrobianos.....	30
4.3 Uso de fármacos antirretrovirais.....	31
5 Discussão.....	33
6 Conclusões.....	40
7 Referências.....	42
8 Anexos.....	50

8.1 Anexo A – Comitê de Ética em Pesquisa	51
8.2 Anexo B – Normas da Revista Anaerobe	53
8.3 Anexo C – Tabela 1.....	68
8.4 Anexo D – Tabela 2	69
8.5 Anexo E – Tabela 3	70
8.6 Anexo F– Tabela 4	71

Introdução

1. INTRODUÇÃO

Pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) têm um maior risco de desenvolver diferentes enfermidades bucais e sistêmicas de natureza infecciosa, quando comparados a outros pacientes, em função da administração de sedativos e relaxantes musculares, o estado de consciência do paciente, nutrição inadequada, uso de dispositivos para respiração que podem ser colonizados por microrganismos ou permitir a sua disseminação. Além disso, as condições sistêmicas desses indivíduos, por vezes portadores de disfunções cardiovasculares, respiratórias ou imunocomprometidos, entre outros quadros, podem corroborar para a ocorrência de infecções graves, principalmente naqueles em que as condições bucais, como a xerostomia e a dificuldade de proceder a higiene bucal, permitem que o biofilme atue como reservatório de patógenos da microbiota autotócne e exógena [1], [2] e [3].

A microbiota associada às infecções oportunistas e quadros septicêmicos é bastante complexa e a boca pode, nesses pacientes, se converter em importante reservatório de microrganismos oportunistas [4], em particular os membros das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* [5], que apresentam notória resistência a agentes antimicrobianos [6], [7] e [8], além dos anaeróbios bucais, frequentemente envolvidos com as infecções periodontais e outras doenças à distância, em função do envolvimento do sistema cardiovascular [9], [10] e [11]. Esta microbiota, em profunda associação com as deficiências imunológicas e de reparo desses pacientes, bem como a presença de dispositivos para ventilação mecânica, pode aumentar a ocorrência de aquisição de infecções nosocomiais, com elevada mortalidade [1], [3], [12] e [13].

A possibilidade da boca se converter em reservatório de microrganismos de relevância médica vem sendo seriamente considerada [13], [14] [15] e [16], destacando-se as famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, e os gêneros *Staphylococcus* ou *Enterococcus*, principalmente *E. faecalis* e *E. faecium*, que são os mais comuns nos processos infecciosos oportunistas ligados à boca, além de relevância em enfermidades infecciosas sistêmicas em pacientes hospitalizados ou que receberam múltiplas terapias antibióticas [17].

Esses microrganismos também estão associados à deterioração das condições dos tecidos periodontais e colaboram para a refratariedade do tratamento de algumas infecções bucais, assim como os microrganismos anaeróbios que constituem parcela significativa do biofilme bucal [6], [18], [19] e [20], mas que também podem ser associados à maturação do biofilme e a quadros sépticos graves [21]. Nessas condições, o ambiente de baixo potencial de óxido-redução acaba facilitando a instalação e proliferação desses microrganismos [16], [22] e [23], o que colabora para reduzir a susceptibilidade microbiana a diferentes agentes terapêuticos [24], [25], [26] e [27], além de favorecer a disseminação desses agentes infecciosos para sistemas fisiológicos distantes da boca, como sistema nervoso central e cardiovascular [11], [28] e [29].

Em pacientes com próteses totais, esses microrganismos podem estar presentes, aderidos à base de resina acrílica e permanecem na boca após a remoção do dispositivo protético, tanto em função de dificuldades de higiene como devido à adesão microbiana às mucosas [30], embora suas populações possam diminuir após a extração dental [31]. É possível que as características químico-físicas dos dispositivos protéticos facilitem a colonização da boca por microrganismos capazes de formar um complexo biofilme e agredir os tecidos do hospedeiro [32], particularmente aqueles com dificuldades no controle do biofilme e/ou que são portadores de morbidades, como imunossupressão.

Em função de suas peculiaridades metabólicas e susceptibilidade ao oxigênio, o isolamento e caracterização desses microrganismos oportunistas mais exigentes não é uma rotina [10], principalmente nos hospitais brasileiros, o que pode falsear os dados sobre a etiologia e disseminação dessas infecções oportunistas em unidades de terapia intensiva [8] e [33], comprometendo a eficiência do tratamento instituído, uma vez que essas espécies anoxibiontes apresentam perfis de susceptibilidade a antimicrobianos bastante diferenciados dos microrganismos de outros sítios anatômicos e que constituem a microbiota exógena à boca [34].

As condições de saúde bucal e a composição dessa microbiota bucal podem ser de relevância no desenvolvimento e validação de medidas preventivas [35] e [36], sendo que a eficácia dos protocolos existentes é questionável, pois não existe uma homogeneidade na literatura sobre a eficiência dos protocolos preventivos e de tratamento mais empregados [7], [29], [37] e [38].

Dessa forma, a determinação de fatores individuais capazes de facilitar o desenvolvimento de quadros infecciosos e a eficácia dos procedimentos associados à prevenção dessas enfermidades, em pacientes edêntulos mantidos em unidades de terapia intensiva, pode colaborar para que novos protocolos de atendimento sejam instituídos e facilitem a recuperação desses pacientes [39].

Proposição

2. PROPOSIÇÃO

Em função da problemática da participação de membros da microbiota bucal e patógenos exógenos capazes de se instalar na boca no desenvolvimento das infecções oportunistas em pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva, o presente estudo teve os seguintes objetivos correlacionar as condições bucais dos pacientes atendidos em uma unidade de terapia intensiva e a ocorrência de infecções respiratórias ou quadros septicêmicos, caracterizar a microbiota bucal de pacientes que desenvolveram esses quadros sépticos ao longo do período de internação, bem como traçar possíveis correlações entre as condições bucais desses pacientes, sua microbiota e a contaminação observada nos espécimes obtidos.

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo teve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp, cujo número do Certificado de Apresentação para Apreciação Ética- CAAE é 14982313.1.0000.5420 (ANEXO A).

Optou-se por utilizar as amostras referentes apenas aos pacientes desdentados totais mantidos em unidades de terapia intensiva em função de representarem aproximadamente 75% do total de amostras, buscando, com isso, garantir os requisitos de homocedasticidade do grupo amostral para a análise estatística.

3.1 Pacientes com Infecções Graves e/ou Quadros septicêmicos

Esse estudo tomou como base a epidemiologia de infecções respiratórias e urinárias e quadros septicêmicos, bem como o total de pacientes que desenvolveram essas condições estando internados em uma unidade de terapia intensiva de referência regional no município de Araçatuba, Estado de São Paulo.

Dos pacientes atendidos, 156 indivíduos apresentaram quadros sépticos graves. Estes pacientes foram observados e acompanhados e foram coletados os dados referentes ao tempo de internação, histórico médico, uso de medicação, resultado do tratamento instituído, bem como as amostras clínicas de secreção respiratória, saliva, biofilme bucal, sangue e urina – esses dois últimos para os pacientes que desenvolverem infecções generalizadas.

Apenas os pacientes que possuíam condições de saúde para a realização de exames clínicos intrabucais foram incluídos no estudo, além de apresentarem registro médico desde o início da sua internação na unidade de terapia intensiva, com todos os medicamentos utilizados, principalmente aqueles que apresentam atividade antimicrobiana ou eram capazes de alterar o fluxo salivar. Os pacientes não receberam tratamento médico ou odontológico nos seis meses que precederam o estudo, tampouco haviam recebido

medicação com atividade antimicrobiana sistêmica nesse período, antes da internação e coleta dos espécimes clínicos.

Os pacientes que eram dentados, totais ou parciais, ou que receberam medicações prévias que comprometessem o estudo, que não possuíam dados suficientes em seu histórico médico, bem como os que não estavam em condições de avaliação devido seu estado de saúde ou que os familiares não concordaram com a coleta, não foram incluídos na pesquisa. Após apresentação do projeto aos familiares dos pacientes, os mesmos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, concordando com a coleta dos espécimes clínicos e dados do prontuário médico dos pacientes.

As informações médicas foram obtidas por meio de prontuários dos pacientes, acrescentando-se os dados fornecidos pelos familiares e, quando possível, pelo próprio paciente, após alta do tratamento. Os dados relativos às contagens de linfócitos T CD4+ (para aqueles que mostravam quadros de imunossupressão), T CD8+, relação CD4+/CD8+, colesterol, triglicérides, índice de massa corporal, avaliação quantitativa e qualitativa do leucograma e contagem plaquetária também foram obtidos periodicamente durante a internação dos pacientes e inseridos nos modelos de estudos em avaliação.

Foram realizados os exames clínicos intra e extrabucais assim que o quadro séptico foi diagnosticado pelos profissionais da equipe de saúde ou no terceiro dia de internação na unidade de terapia intensiva.

3.2. Exame clínico bucal

No exame clínico, observava-se às condições da mucosa bucal, verificando-se a presença de sinais de processos inflamatórios e/ou infecciosos, xerostomia aparente, possível linfadenopatia e a presença de lesões ulceradas ou hiperplásicas, relação entre as características observadas e a presença de dispositivos para ventilação artificial e ou intervenções médicas nas 72 horas anteriores. Após o exame inicial era realizado a coleta e dos espécimes clínicos e após era instituído protocolo de higienização com gaze e

clorexidina a 0,12%, bem como os pacientes com necessidade de biópsias e/ou tratamentos imediatados eram passados os dados ao médico responsável para estabelecer tratamento adequado.

3.3 Coletas dos espécimes clínicos: saliva, mucosas, secreções respiratórias, sangue e urina.

Para a coleta de saliva foram utilizados Salivettes (Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Alemanha), que permaneciam na cavidade bucal dos pacientes por 15 segundos, armazenados em eppendorf e eram centrifugados a 5.000 x g. por 2 minutos. A seguir, saliva resultante era transferida para criotubos contendo água ultrapura (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) que eram armazenados a -196°C, até a extração do DNA bacteriano.

As amostras provenientes das mucosas bucais eram coletadas por meio de zaragatoas (Applimed, São Paulo, Brasil), que eram gentilmente friccionadas contra o dorso da língua, assoalho de boca, vestibulo bucal e mucosa jugal, e, após a coleta, as zaragatoas utilizadas eram transferidas para tubos contendo 200 mL água ultrapura.

Para os pacientes com secreções respiratórias, o aspirado brônquico e demais secreções envolvidas nos quadros sépticos eram coletadas assepticamente e transferidas para tubos contendo água ultrapura. Para os pacientes apresentando quadros septicêmicos, amostras de sangue periférico (3mL) eram coletadas e mantidas em anticoagulante (heparina 0,2 mL por mL de sangue), até o processamento laboratorial. Nesses quadros septicêmicos e quando os pacientes apresentavam envolvimento do sistema urinário na infecção, amostras de urina eram retiradas assepticamente das bolsas coletoras e enviadas para o laboratório por meio de recipientes específicos para coleta de urina.

Todas as amostras foram mantidas em nitrogênio líquido até o processamento laboratorial para a extração do DNA microbiano e detecção dos principais microrganismos alvo através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

3.4. Extração do DNA microbiano.

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água ultra pura foram extraídos através do protocolo de lise por fervura e congelamento [40] e o DNA obtido foi mantido a -80°C, até as reações de amplificação. As concentrações de DNA bacteriano foram determinadas em espectrofotômetro ($A_{260\text{ nm}}$).

3.5. Detecção dos microrganismos alvo por PCR

A presença de bactérias membros do domínio *Archaea*, das famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, bem como as espécies, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola*, foram avaliadas por amplificação do DNA por PCR, empregando-se iniciadores e condições específicas para cada agente infeccioso [10], [41], [42] e [43], em termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400 e 9700).

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 μl , contendo 2,5 μl de 10 X tampão PCR, 1,25 μl de MgCl_2 (50 mM), 2,0 μl de dNTP (10 mM), 0,25 μl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 μl de cada iniciador (0,4 μM), 7 μl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 μl de DNA (ng). Procedeu-se a amplificação em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); de 30 a 36 ciclos de 94°C (1 min.), temperatura de anelamento de cada iniciador por um tempo que variou de 30s. a 2 min., 72°C (1 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA em amplificação.

Para todas as reações foram utilizadas, como controle positivo, DNA de cepas de referência dos microrganismos estudados. Os produtos da amplificação pelo PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 $\mu\text{g/ml}$) e fotografados sobre transiluminador de luz UV, com câmara Kodak (Eletrophoresis

Documentation and Analyses System 120). Como padrão de peso molecular utilizou-se o marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP). Os reagentes para as reações de amplificação do DNA microbiano foram obtidos de Sigma Aldrich (Saint Louis, Illinois, Estados Unidos da América).

3.6. Análise estatística

O teste de Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar a significância das associações entre três ou mais elementos, como a existência de interrelações entre as diferentes condições clínicas. As comparações dicotômicas foram avaliadas através do teste de Mann-Whitney e teste T de Student. As inter-relações entre os parâmetros clínicos e os aspectos microbiológicos foram analisadas por meio do teste de correlações de Spearman.

Os dados foram encaminhados e analisados no Departamento de Matemática da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira-UNESP, adotando-se o nível de significância de 5%.

Resultados

4. RESULTADOS

Dos 156 pacientes, 96 (61,5%) eram homens e 60 (38,5%) mulheres, sendo a idade média dos paciente internados de 45 anos. Dentre os pacientes, 133 pacientes (85,2%) eram HIV-positivos, 16 (10,3%) eram HIV-negativos e 7 pacientes (4,5%) apresentaram quadros de sepse, (Tabela 2). A associação entre internação e soropositividade para o vírus HIV mostrou correlação estatística ($p < 0,01$), o mesmo ocorrendo com o sexo dos pacientes, com predomínio de pacientes do sexo masculino ($p = 0,43$), sendo que também observou-se maior carga viral, taxa de hemoglobina total e hematócrito nos pacientes homens, enquanto as outras variáveis sanguíneas não apresentaram associações estatisticamente significantes.

4.1. Condições do paciente

A maior parte dos pacientes do estudo (85,2%) era portadora do vírus HIV. Dos 156 pacientes 10,3% apresentavam outros diagnósticos, como lesões traumáticas, dengue, tuberculoses, e ainda 4,5% desses pacientes foram diagnosticados com sepse. Em relação a esse diagnóstico clínico foi possível observar que nos pacientes hospitalizados HIV-positivos as taxas de hemoglobina total (HB) e hematócrito (HT%) estavam significativamente mais elevadas ($p \leq 0,05$) do que nos pacientes com sepse, sendo que o aumento da idade do paciente influenciou no aumento da prevalência de casos de sepse.

As outras variáveis sanguíneas não apresentaram relevância estatística na amostra. Nos pacientes HIV+ também foi possível observar ocorrência significativamente relevante ($p \leq 0,05$) na maioria das amostras positivas para *Archaea*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythia*, família *Pseudomonadaceae*, *P. aeruginosa*, e família *Enterobacteriaceae*, exceto os sítios saliva e secreção de mucosa, os quais foram mais prevalentes nos pacientes com sepse. Os sítios “dreno” e “prótese” não apresentaram prevalências significantes de nenhum dos microrganismos avaliados.

Quando os pacientes HIV-positivos foram comparados aos pacientes HIV-negativos, observou-se que os primeiros são significativamente mais jovens e que a taxa de leucócitos estava bastante reduzida entre nesses pacientes.

Pelo teste de correlações de Spearman, verificou-se, nos pacientes HIV-positivos, uma ocorrência relevante ($p \leq 0,05$) de *Archaea*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *T. denticola*, *T. forsythia*, família *Pseudomonadaceae*, *P. aeruginosa*, e família *Enterobacteriaceae*, exceto os sítios “saliva”, “dreno” e “prótese” para *P. nigrescens*, *P. intermedia*, *T. forsythia*, família *Pseudomonadaceae*, *P. aeruginosa* e família *Enterobacteriaceae*, além do sítio “mucosa” para *Archaea*, *C. rectus*, *E. corrodens* e *T. denticola*, os quais não apresentaram prevalências significantes em nenhum dos espécimes coletados, para ambos os diagnósticos referidos.

O sítio “dreno” só foi relevante para *P. gingivalis*, sendo mais prevalente nos pacientes HIV-positivos. Somente o sítio mucosa para *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. intermedia*, família *Pseudomonadaceae*, *P. aeruginosa* e família *Enterobacteriaceae* apresentou prevalência maior entre os pacientes HIV-negativos do que nos pacientes soropositivos.

4.2. Uso de antimicrobianos

Em relação ao uso de fármacos antimicrobianos (considerando o $n=113$ válido para esta variável), somente 5,3% dos pacientes do estudo estavam em terapia antimicrobiana no momento da coleta dos espécimes, estando os demais sob o efeito de fármacos imunoestimuladores e/ou antirretrovirais (Tabela 2).

Foi possível observar que nos pacientes hospitalizados em que não havia sido usada terapia antimicrobiana, as taxas de hemoglobina total (HB) e hematócrito (HT%) estavam significativamente mais elevadas, enquanto o número de leucócitos e plaquetas estavam significativamente reduzidos ($p \leq 0,05$) em relação aos pacientes que estiveram sob uso de

antibióticos. As outras variáveis relativas aos resultados do hemograma sanguíneas não apresentaram relevância estatística.

Nos pacientes que não fizeram uso da terapia antimicrobiana, a prevalência de amostras positivas foi significativamente maior para quase todos os microrganismos testados e espécimes coletados, exceto nos sítios “saliva” e “secreção de mucosa” para *P. gingivalis*, *P. intermedia*, e família *Enterobacteriaceae*, ou “saliva” para *T. denticola*, e “secreção de mucosa” para *E. corrodens*, *P. nigrescens* e família *Pseudomonadaceae*, os quais apresentaram prevalência maior nas amostras dos pacientes que utilizaram antibióticos. Não houve prevalência significativa no sítio “prótese” para os microrganismos estudados.

Quando comparou-se ($p \leq 0,05$) o uso de fármacos antimicrobianos e o não uso de quaisquer medicamentos (considerando o $n=29$ válido para esta variável), observou-se que prevalência estatisticamente significativa em quase todos os sítios avaliados para os principais microrganismos estudados, sendo maior nos pacientes que não usavam antibióticos, exceto nos sítios “saliva” para *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *P. Intermedia*, *T. denticola* e família *Enterobacteriaceae*, e o sítio “secreção de mucosa” para *P. nigrescens* e *P. intermedia*, os quais apresentaram maior prevalência de microrganismos nos pacientes que fizeram uso de antimicrobianos.

4.3. Uso de fármacos antirretrovirais

Quanto ao uso de fármacos imunoestimuladores e/ou antirretrovirais, considerando o $n=130$ válido para esta variável, a maioria (82,3%) dos pacientes do estudo fazia uso dessas medicações (Tabela 2). Foi possível observar que a carga viral e os níveis de leucócitos estavam significativamente mais elevados ($p \leq 0,05$) nos pacientes que não faziam uso de antirretrovirais. Quanto à ocorrência dos microrganismos estudados, só houve prevalência estatisticamente significativa nos sítios “urina” e “aspirado brônquico” para *P. gingivalis*.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A diversidade da microbiota bucal tem sido reconhecida por décadas, constando de mais de 700 espécies de microrganismos identificadas nesse habitat [44]. Assim sendo, a manutenção da saúde bucal do paciente assistido na UTI pode afetar a saúde dos tecidos bucais, ou causar infecções à distância e influenciar decididamente em todo o bem-estar do paciente dependente [45], destacando-se que esse paciente tem um maior risco de desenvolver diferentes enfermidades bucais, quando comparados com outros pacientes [1], [2] e [3].

Muitos desses pacientes se encontram totalmente dependentes de cuidados e impossibilitados de manter uma higienização bucal adequada, necessitando do suporte de familiares e/ou profissionais da saúde para esta e outros tipos de tarefas. Um estudo feito por E.-Y. Chan e I. Hui-Ling Ng (2012) [46], indicou que os enfermeiros não tinham conhecimento sobre saúde bucal e geralmente estavam mal preparados para oferecer boa higiene para pacientes gravemente doentes. Desde que os conhecimentos de higiene bucal dos enfermeiros foi adquirido durante a sua educação básica de enfermagem, os mesmos se mostram insuficientes para prepará-las para o desafio de cuidar da higiene bucal de pacientes criticamente enfermos, principalmente quando se verifica que muitos dos patógenos mais comuns nas amostras extra-bucais desses pacientes se origina do ambiente bucal, mesmo em pacientes que não possuem elementos dentais, como os do presente estudo, o que enfatiza a necessidade de formação contínua dos profissionais envolvidos nos cuidados do paciente, incluindo cuidados bucais .

A microbiota associada às infecções oportunistas e quadros septicêmicos é complexa e a cavidade bucal pode se converter em importante reservatório de microrganismos oportunistas [4], em particular os membros da família *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, microrganismos que apresentam comprovada resistência a antimicrobianos [5], [6], [7] e [8], além de anaeróbios bucais, frequentemente associados às

infecções periodontais e mesmo outras doenças à distância, em função do envolvimento do sistema cardiovascular [9], [10 e [11], ou seja, esta microbiota associada ao quadro clínico do paciente hospitalizado por um certo período de tempo, aumenta a suscetibilidade de aquisição de infecções nosocomiais, que colaboram para a elevada mortalidade desses pacientes [1], [2] e [13].

Baseado nestas informações, se justifica a necessidade de cuidados bucais sistemáticos em pacientes internados em unidades de terapia intensiva [37], [47] e [48], por meio do controle mecânico do biofilme dentário [37], [48] e [49], associado ao controle químico [50], visando a prevenção de aspiração do conteúdo bucal e orofaríngeo contaminado, reduzindo o risco de infecções respiratórias, porém não há um protocolo preventivo universalmente eficaz, variando as soluções antimicrobianas e suas concentrações, bem como os métodos de aplicação, mas para a utilização desses agentes existe a necessidade de preparo da equipe de saúde e um conhecimento mais detalhado de como microrganismos bucais podem vir a interferir em infecções graves [3] e [29].

Pacientes infectados pelo vírus HIV, podem ter aumento da susceptibilidade às doenças bucais, como a gengivite e periodontite, devido a imunossupressão causada pela infecção do HIV, expondo o organismo a agressões de microrganismos endógenos e exógenos, como *Pseudomonas*, *Enterobacter*, entre outros presentes na cavidade bucal desses pacientes. Um recente estudo realizado por Tonsiello et. al. (2015) [51], mostrou um caso de espondilodiscite infecciosa por *Pseudomonas aeruginosa* em um paciente com imunossupressão devido ao HIV e co-infecção com HCV, quadro que agrava e complica o tratamento de pacientes debilitados e em situações onde intervenções devem ser cuidadosas, como em pacientes de UTIs.

De acordo com Schaffer (2015) [12], um pequeno número de bactérias patogênicas, como *Pseudomonas aeruginosa*, está relacionado com infecções pulmonares. Os resultados aqui apresentados evidenciaram que esta espécie foi detectada em diversos vários sítios

nos pacientes avaliados, como sangue, urina, aspirado brônquico e sítios intrabucais, como próteses, facilitando a disseminação e agravamento dos quadros relacionados aos pacientes hospitalizados. Entretanto, no presente estudo, a ocorrência desses microrganismos oportunistas exógenos foi bastante discreta, em todos os pacientes estudados, independentemente da condição imunológica.

A carga viral (CV) plasmática detectável em indivíduos com HIV pode ser associada a níveis elevados de agentes periodontopatogênicos conhecidos, tais como *E. corrodens*, *P. nigrescens* e *T. forsythia* na cavidade bucal destes pacientes [52]. Neste estudo, patógenos exógenos à microbiota bucal foram raramente encontrados na cavidade bucal de pacientes internados em UTI, observando-se também a presença de alguns microrganismos bucais em amostras extraorais, sugerindo que esses últimos podem ser relevantes no desenvolvimento de quadros sépticos nos pacientes, a despeito da relevância dada apenas aos organismos entéricos ocasionalmente observados na boca. A ocorrência desses microrganismos bucais nessas amostras extrabucais (sangue, aspirado) podem ter relação com a deterioração das condições de saúde bucal dos pacientes, uma vez que a presença de mucosite em maior ou menor grau é característica que frequentemente se desenvolve. A correlação negativa entre a presença de leucócitos e muitos microrganismos bucais e exógenos à cavidade bucal (teste de Correlação de Spearman) demonstrou a fragilidade e susceptibilidade às doenças bucais apresentadas pelos pacientes internados em UTI, uma vez que muitos deles apresentam baixíssima contagem de leucócitos, podendo agravar quadros bucais inflamatórios e gerar maior risco às doenças respiratórias de origem bucal.

Os resultados microbiológicos evidenciaram a ocorrência de todos os microrganismos estudados. Desde que foi observada a presença de mucosite de graus variados na quase totalidade dos pacientes estudados, pode-se questionar se as espécies bacterianas Gram-negativas, como o gênero *Porphyromonas*, *Tannerella* e *Prevotella*, além da família *Enterobacteriaceae* e pseudomonados, que são portadores de endotoxinas biologicamente capazes de induzir ou agravar o quadro inflamatório, não poderiam ter um

papel no agravamento do quadro clínico bucal. Estudos longitudinais deverão ser realizados para avaliar essa hipótese.

Os microrganismos estudados foram frequentes em todos os grupos de pacientes, mas mostraram-se mais prevalentes em mais sítios de pacientes portadores do vírus HIV, porém também houve aumento nos sítios de pacientes HIV-, evidenciando que outros fatores podem estar predispondo à presença desses patógenos, podendo citar como exemplo, o fato de que tais patógenos foram mais comuns em pacientes que mostravam baixos níveis de leucócitos no sangue periférico, mesmo com contagens satisfatórias de células CD4+.

Essa colonização por estes microrganismos, como *Pseudomonas aeruginosa* e a família *Enterobacteriaceae*, pode ser transitória, mas não se pode desconsiderar o papel desses microrganismos como agentes das infecções nosocomiais mais agressivas. Essa exacerbação da colonização bucal por microrganismos exógenos adquire grande relevância desde que esses patógenos representam reservatórios de genes de resistência a numerosos antimicrobianos e estão profundamente associados com infecções oportunistas, o que se torna mais importante quando se verifica que esses pacientes se mostram debilitados [6], [7] e [8].

As bactérias do domínio *Archaea* são mesófilas, anaeróbias obrigatórias que também são denominadas de metanogênicas. Vianna et al (2006) [53] em seu estudo sobre a identificação e quantificação de *Archaea* em infecções endodônticas mostrou que bactérias metanogênicas estão implicadas em doenças infecciosas orais. Isto pode então contribuir para o agravamento do quadro clínico de pacientes debilitados, quando este microrganismo é disseminado no organismo do paciente. Neste estudo os resultados mostraram que os sítios acometidos foram os mesmos, não sendo encontrados mais sítios em pacientes HIV+. Ainda são necessários muitos outros estudos devido à complexidade deste domínio. De acordo com Gonçalves et al. (2013) [54] indivíduos soronegativos apresentaram maior

prevalência do microrganismo quando comparados com pacientes HIV positivos usuários de antirretrovirais.

As bactérias do gênero *Enterobacter* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, e são bactérias gram-negativas, anaeróbias facultativas, geralmente encontradas na pele humana e plantas, bem como no solo, água, esgoto, trato intestinal, urinário e respiratório de humanos e animais e alguns produtos lácteos [55]. São considerados como patogênicos, são organismos transitórios da cavidade bucal e pode ganhar a entrada através de hábitos perniciosos orais ou devido à manutenção má higiene, sendo os organismos entéricos na cavidade bucal responsáveis pela celulite pós extração do assoalho bucal e da região de orofaringe. Enterobactérias, tais como *E. aerogenes* e *E. coli*, juntamente com outros organismos Gram-negativos são os agentes causadores de osteomielite da mandíbula, agravando muito o quadro de pacientes hospitalizados [56]. Em nosso estudo foram encontrados microrganismos em mais sítios de pacientes não usuários de antimicrobianos, enquanto os que faziam uso de prótese não se mostraram alterados em relação a esta variável. Isto talvez relacionado com provável terapia antimicrobiana correta, embora parte seja resistente a muitos antibióticos. Os pacientes HIV+ mostraram maior prevalência dos microrganismos estudados, quando comparados com HIV-, revelando que a imunossupressão pode ter interferido na microbiota do paciente, ou não estava controlada por antirretrovirais. Fica claro que este tipo de paciente, somado ao fato da internação prolongada e quadros de outras co-morbidades sistêmicas, necessita de um acompanhamento adequado e maior controle dos fatores relacionados as infecções oportunistas oriundas de microrganismos provenientes da cavidade bucal.

A presença de anaeróbios bucais no sangue periférico, tanto na presença de quadros infecciosos graves e mesmo em condições de saúde, é uma realidade que vem sendo associada às doenças vasculares [11]. Essa via de disseminação pode estar envolvida nas infecções ósseas por microrganismos bucais [10], existindo evidências que sugerem que tamanha contaminação, naqueles pacientes que se recuperam, pode provocar

danos que se perpetuam e essa característica possivelmente vem atingindo a espécie humana mesmo antes de estruturação da civilização urbana [57]. Dessa forma, tendo em vista que a atividade proteolítica desses microrganismos também possui relação direta com sua adesão aos tecidos do hospedeiro, e que as modificações teciduais induzidas pelo tratamento, como radioterapia que alguns pacientes se sujeitam, acabam por diminuir o aporte sanguíneo e, por conseguinte, reduz o potencial redox tecidual, facilitando uma possível invasão tecidual [58], o que pode vir a ocorrer quando associado com fatores traumáticos, o paciente pode ficar susceptível a desenvolver infecções nosocomiais severas, que comprometem o tratamento e colocam o sujeito em situações que ameaçam tanto sua qualidade de vida quanto a sua longevidade.

Evidências indicam que pneumonias nosocomiais de origem aspirativa são a principal causa de morbidade e mortalidade entre pacientes hospitalizados [59], sendo que há evidências convincentes de que a atuação de uma equipe de saúde bucal pode produzir resultados cruciais na prevenção da pneumonia aspirativa. Assim sendo, por meio de análise microbiológica, foi possível demonstrar que a fragilidade da saúde bucal de pacientes imunodeprimidos internados em UTI pode ser um agravante na deterioração e agravamento do quadro sistêmico do paciente.

Conclusão

6- CONCLUSÃO

Com base nos dados analisados e na literatura discutida, concluiu-se que a fragilidade da saúde bucal de pacientes internados em UTI, por vezes com imunossupressão, juntamente com a colonização e/ou infecção local/sistêmica por microrganismos oportunistas, pode ser um fator agravante na deterioração e piora do quadro geral do paciente.

O presente estudo ainda mostrou que alguns microrganismos anoxibiontes oriundos do ambiente bucal podem vir a participar de infecções respiratórias e/ou sistêmicas, o que reforça a necessidade de controle da higiene bucal no ambiente hospitalar, mesmo para pacientes desdentados totais.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Stonecypher K. Ventilator-associated pneumonia the importance of oral care in intubated adults. *Critical Care Nurse Quarterly*; v. 33, p. 339–347, 2010.
2. Snyders O, Khondowe O, Bell J. Oral chlorhexidine in the prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill adults in the ICU: a systematic review. *Southern African Journal of Critical Care*; v. 27, p.48–56, 2011.
3. Özden D, Türk G, Düger C, Güler EK, Tok F, Gülsoy Z. Effects of oral care solutions on mucous membrane integrity and bacterial colonization. *Nurs Crit Care*. v. 19, n. 2, p. 78-86, 2014.
4. Tets VV, Tets GV, Vikina DS, Vechevovskaia MF, Kharlamova VV. Unknown pathogens from the human oral microflora of interest for otorhinolaryngology. *Vestn Otorinolaringol*. V. 1, p. 33-6, 2014.
5. Gaetti-Jardim Jr E., Avila-Campos MJ., Ciesielski FIN., Sousa F R N. Occurrence of yeasts, pseudomonads and enteric bacteria in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. *Braz. J. Microbiol.*, v.42, p.1047 - 1055, 2011.
6. Bousbia S.; Papazian L.; Saux P.; Fore J M.; Auffray JP.; Martin C.; Raoult D.; Scola BL.. Repertoire of intensive care unit pneumonia microbiota. *PLoS ONE* 7(2): e32486, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0032486
7. Kusahara DM.; Peterlini MAS.; Pedreira MLG. Oral care with 0.12% chlorhexidine for the prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill children: randomised, controlled and double blind trial. *Int. J. Nurs. Stud*, v. 49, p. 1354–1363, 2012.
8. Gaetti-Jardim Jr E.; Okamoto AC.; Melo ME.; Schweitzer CM. Opportunistic microorganisms in patients with head and neck trauma. *Arch. Health Invest.*, v. 2, p. 16-23, 2013.

9. Garcia, R. A review of the possible role of oral and dental colonization on the occurrence of health care-associated pneumonia: underappreciated risk and a call for interventions. *Amer. J. Infect. Control*, v. 33, p. 527-541, 2005.
10. Gaetti-Jardim Jr, E., Landucci LF., Oliveira KL., Costa I., Ranieri R V., Okamoto AC, Schweitzer C M. Microbiota associated with infections of the jaws. *Int. J. Dent.*, v.2012, p.1 - 8, 2012a.
11. Marcelino S L.; Gaetti-Jardim Jr E.; Nakano V, Canônico LA, Nunes FD, Lotufo RF, Pustiglioni, F E.; Romito GA.; Avila-Campos MJ. Presence of periodontopathic bacteria in coronary arteries from patients with chronic periodontitis. *Anaerobe*, v.16, p. 629-632, 2010.
12. Schaffer, K. Epidemiology of infection and current guidelines for infection prevention in cystic fibrosis patients. *Journal of Hospital Infection*. V. 89, p.309-313, 2015.
13. Zuanazzi D.; Souto R.; Mattos, MBA.; Zuanazzi MR.; Tura BR.; Sansone C.; Colombo APV. Prevalence of potential bacterial respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalised individuals. *Arch. Oral Biol.*, v. 55, p. 21-28, 2010.
14. Paju S.; Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis.*, v. 13, p. 508-512, 2007.
15. Heo SM.; Haase EM.; Lesse AJ.; Gill SR.; Scannapieco FA. Genetic relationship between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit. *Clin. Infect. Dis.*, v. 47, p. 1562-1570, 2008.
16. Bizzarro S.; Loos BG.; Laine M L.; Crielaard W.; Zaura E. Subgingival microbiome in smokers and non-smokers in periodontitis: an exploratory study using traditional targeted techniques and a next-generation sequencing. *J. Clin. Periodontol.*, 2013.doi: 10.1111/jcpe.12087.

17. Furtado I.; Xavier PCN.; Tavares LVM.; Alves F.; Martins SF.; Martins AS.; Palhares DB. *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* in blood of newborns with suspected nosocomial infection. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, v.56, n.1, p. 77-80, 2014.
18. Abiko, Y.; Sato, T.; Mayanagi, G.; Takahashi, N. Profiling of subgingival plaque biofilm microflora from periodontally healthy subjects and from subjects with periodontitis using quantitative real-time PCR. J. Periodont. Res. v. 45, p. 389-395, 2010.
19. Amel, Y.; Bouziane, D.; Ahmed, MLB. Microbiological study of periodontitis in the west of Algeria. World J. Med. Sci., v. 5, p. 07-12, 2010.
20. Balaei-Gajan, E.; Shirmohammadi, A.; Abashov, R.; Agazadeh, M.; Faramarzie, M. 2010 Detection of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis. Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal., v. 15, e667-670, 2010.
21. Presterl E, Grisold AJ, Reichmann S, Hirschl AM, Georgopoulos A, Graninger W. 2005. *Viridans streptococci* in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. J. Antimicrob. Chemother. 55:45–50..
22. Khocht A.; Yaskell T.; Janal M.; Turner BF.; Rams TE.; Haffajee AD.; Socransky, S. S. Subgingival microbiota in adult Down syndrome periodontitis. J. Periodont. Res., v. 47, p. 500–507, 2012.
23. Koyanagi, T.; Sakamoto, M.; Takeuchi, Y.; Maruyama, N.; Ohkuma, M.; Izumi, Y. Comprehensive microbiological findings in peri-implantitis and periodontitis. J. Clin. Periodontol., v. 40, p. 218 - 226, 2013.
24. Ardila C M.; Granada MI.; Guzmán IC. Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. J. Periodont. Res., v. 45: 557–563, 2010.

25. Hoiby N.; Bjarnsholt T.; Givskov M.; Molin S.; Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* v. 35, p. 322-332, 2010.
26. Roberts AP. Oral biofilm: a reservoir of transferable, bacterial, antimicrobial resistance. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* v. 8, p. 144-1450, 2010.
27. Marsh GA, Haining J, Hancock TJ, Robinson R, Foord AJ, Barr JA, et al. Experimental infection of horses with Hendra virus/Australia/Horse/2008/Redlands. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:2232–8 . 10.3201/eid1712.111162.
28. Gaetti-Jardim Jr E.; Marcelino, SL.; Feitosa A C.; Romito GA.; Avila-Campos MJ. Quantitative detection of periodontopathic bacteria in atherosclerotic plaques from coronary arteries. *J. Med. Microbiol.*, v. 58, p. 1568-1575, 2009.
29. Özçaka Ö.; Basoglu ÖK.; Buduneli N.; Tasbakan MS; Bacakoglu F.; Kinane DF. Chlorhexidine decreases the risk of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients: a randomized clinical trial. *J. Periodont. Res.*, v. 47, p. 584 – 592, 2012.
30. Lucena-Ferreira SC, Ricomini-Filho AP, Silva WJ, Cury JA, Cury AA. Influence of daily immersion in denture cleanser on multispecies biofilm. *Clin Oral Investig.*, v.18, n.9, p. 2179-85, 2014. doi: 10.1007/s00784-014-1210-9
31. Siddiqi A, Milne T, Cullinan MP, Seymour GJ. Analysis of *P. gingivalis*, *T. forsythia* and *S. aureus* levels in edentulous mouths prior to and six months after placement of one-piece zirconia and titanium implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, p.1–7, 2014. doi: 10.1111/clr.12536
32. Oilo M, Bakken V. Biofilm and Dental Biomaterials. *Materials*, V.8, p. 2887-2900, 2015. doi:10.3390/ma8062887
33. Vandecandelaere I, Matthijs N, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Vosters P.; De Bus, L.; Nelis, H.J.; Depuydt, P.; Coenye, T. Assessment of microbial diversity in biofilms

- recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. PLoS ONE, v. 7, p. e38401. doi:10.1371/journal.pone.0038401
34. Nozaki TA. sensitive method for detecting *Porphyromonas gingivalis* by Polymerase Chain Reaction and its possible clinical application. J. Periodontol., v. 72, p.1228-35, 2001. Grap, M. J.; Munro, C. L. Preventing ventilator-associated pneumonia: evidence-based care. Crit. Care Nurs. Clin. N. Amer., v. 16, p. 349-358, 2004.
35. Grap MJ.; Munro CL.; Unoki T.; Hamilto A; Ward KR. Ventilator-associated pneumonia: the potential critical role of emergency medicine in prevention. J. Emerg. Med., v. 42, p. 353-362, 2012.
36. Grap MJ.; Munro CL.; Unoki T.; Hamilto A; Ward KR. Ventilator-associated pneumonia: the potential critical role of emergency medicine in prevention. J. Emerg. Med., v. 42, p. 353-362, 2012.
37. Lam OLT; McGrath C; Li LSW.; Samaranayake LP. Effectiveness of oral hygiene interventions against oral and oropharyngeal reservoirs of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative bacilli. Amer. J. Infect. Control, v. 40, p. 175-82, 2012.
38. Sebastian MR.; Lodha R; Kapil A.; Kabra, S.K. Oral mucosal decontamination with chlorhexidine for the prevention of ventilator-associated pneumonia in children—A randomized, controlled trial. Pediatr Crit Care Med. v.13, n.5, p.305-310, 2012.
39. Marra AR; Rodrigues RG.; Silva CVS; Caserta RA.; Paes AT; Moura DF.; Santos OF P; Edmond MB. Successful prevention of ventilator-associated pneumonia in an intensive care setting. Amer. J. Infect. Control, v. 7, p. 619-625, 2009.
40. Santos AR, Goes Filho JT, Nery JAC, Duppre NC, Gallo Men, Suffys PN & Degraev W. Evaluation of PCR mediated DNA amplification in non-invasive biological specimens for subclinical detection of *Mycobacterium leprae*. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 1995. 11:113-120.

41. Ashimoto A; Chen C; Bakker I; Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions, *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 11, p. 266-273, 1996.
42. Spilker T; Coenye T; Vandamme P; LiPuma JJ. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 2074-9, 2004.
43. Gaetti-Jardim Jr E; Fardin AC; Gaetti-Jardim, E C.; Castro AL.; Schweitzer CM.; Avila-Campos MJ. Microbiota associated with chronic osteomyelitis of the jaws. *Braz. J. Microbiol.*, v.41, p.1056 - 1064, 2010.
44. Souto R, Silva-Boghossian CM, Colombo AP. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Braz J Microbiol*; v. 29, n.45(2), p.495-501, 2014.
45. Araújo RJG., Oliveira LCG, Hanna LMO, Corrêa AM, Carvalho LHV, Alvares NCF. Análise de percepções e ações de cuidados bucais realizados por equipes de enfermagem em unidades de tratamento intensivo. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, v.21, n.1, p. 38-44, 2009.
46. E.-Y. Chan, I. Hui-Ling Ng. Oral care practices among critical care nurses in Singapore: a questionnaire survey *Applied Nursing Research*, v. 25, p.197–204, 2012.
47. Ishikawa A, Yoneyama T, Hirota K, Miyake Y, Miyatake K. Professional oral health care reduces the number of oropharyngeal bacteria. *J Dent Res*. V.87, n.6, p.594-8. 2008.
48. Tada A, & Miura H. Prevention of aspiration pneumonia (AP) with oral care. *Archives of gerontology and geriatrics. Supplement*, v.55, p.16-21, 2012.

49. van der Maarel-Wierink CD, Vanobbergen J N, Bronkhorst EM, Schols J M, & de Baat, C. Oral health care and aspiration pneumonia in frail older people: a systematic literature review. *Gerodontology*, v.30, p.3-9, 2013. doi: 10.1111/j.1741-2358.2012.00637.x
50. Zhang TT., Tang SS, & Fu LJ. The effectiveness of different concentrations of chlorhexidine for prevention of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Journal of Clinical Nursing*, v.23, p.1461-1475, 2014. doi: 10.1111/jocn.12312.
51. Tonsiello G, Valentinotti R, Stacul F, Giacomazzi D, Luzzati R. Spinal lesions by infectious spondylodiscitis and hepatocellular carcinoma presenting as spinal metastasis in an HIV-HCV co-infected patient. *Infez Med.*v.23, n.2, p.187-91,2015.
52. Pereira VT, Pavan ., Souza RC, Souto R, Vettore MV, Torres SR, Colombo AP, de Uzeda M, Sansone C, Gonçalves LS. The association between detectable plasmatic human immunodeficiency virus (HIV) viral load and different subgingival microorganisms in Brazilian adults with HIV: a multilevel analysis. *J Periodontol.* v.85, p.697-705, 2014. doi: 10.1902/jop.2013.130273.
53. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *J Clin Microbiol.* V. 44, n.4, p.1274-1282, 2006.
54. Gonçalves LS, Gonçalves BM, Fontes TV. Periodontal disease in HIV-infected adults in the HAART era: Clinical, immunological, and microbiological aspects. *Arch Oral Biol.* V. 58, n.10, p.1385-1396, 2013.
55. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American journal of medicine*, v. 119, n. 6, p. S20-S28, 2006.
56. Kamal FG, Bernard RA. Influence of nail biting and finger sucking habits on the oral carriage of *Enterobacteriaceae*. *Contemp Clin Dent.* V.6, p.211-4, 2015.

57. Maixner F, Thomma A, Cipollini G, Widder S, Rattei T, et al. Metagenomic Analysis Reveals Presence of *Treponema denticola* in a Tissue Biopsy of the Iceman. PLoS ONE. V.9, n 6: e99994, 2014. doi:10.1371/journal.pone.0099994
58. Bensandoun RJ et al. Chemotherapy- and radiotherapy-induced mucositis in head and neck cancer patients: new trends in pathophysiology, prevention and treatment. Eur Arch Otorhinolaryngol. V. 258, p.481-7, 2001.
59. Barnes CM. Dental hygiene intervention to prevent nosocomial pneumonias. J Evid Based Dent Pract. V.14 Suppl:103-14, 2014.

Anexo A. Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



PARECER DO COLEGIADO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Microbiota bucal e sua relação com infecções oportunistas em pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva.

Pesquisador: Ana Claudia Okamoto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 14982313.1.0000.5420

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - UNESP

Patrocinador Principal: Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo ((FAPESP))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 283.375

Data da Relatoria: 17/05/2013

Apresentação do Projeto:

Apresentação objetiva e embasada em bibliografia atualizada.

Objetivo da Pesquisa:

Caracterizar a microbiota bucal de pacientes que desenvolveram infecções respiratórias e quadros septicêmicos em unidades de terapia intensiva, ao longo do período de internação, traçando possíveis correlações entre as condições de saúde bucal desses pacientes, sua microbiota e a contaminação observadas nos espécimes obtidos de infecções respiratórias e sangue ou urina, de acordo com o quadro séptico desenvolvido, facilitando a elaboração de medidas preventivas mais adequadas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sem riscos, pois as coletas de material biológico serão realizadas através de métodos não invasivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

encontra-se bem fundamentado sob todos os aspectos pertinentes de análise; além de não apresentar riscos em sua realização, utilizando-se de coletas não invasivas; demonstrará a importância da odontologia hospitalar como forma de diminuir riscos de infecções oportunistas da cavidade oral em indivíduos internados na UTI, confeccionando protocolos de higienização bucal

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193

Bairro: VILA MENDONCA

CEP: 16.015-050

UF: SP

Município: ARACATUBA

Telefone: (18)3636-3200

Fax: (18)3636-3332

E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA - CÂMPUS DE
ARAÇATUBA - JÚLIO DE



Continuação do Parecer: 283.375

para estes pacientes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos apresentados.

Recomendações:

Aprovar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto apresenta-se bem fundamentado sob todos os aspectos considerados, portanto, recomendamos a sua total aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP acata o parecer do relator e recomenda a aprovação do projeto.

ARACATUBA, 24 de Maio de 2013

Assinador por:
Ana Claudia de Melo Stevanato Nakamune
(Coordenador)

Endereço: JOSE BONIFACIO 1193
Bairro: VILA MENDONCA CEP: 16.015-050
UF: SP Município: ARACATUBA
Telefone: (18)3636-3200 Fax: (18)3636-3332 E-mail: anacmsn@foa.unesp.br

ANEXO B- Normas da revista Anaerobe

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Experimental

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented

separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of').

Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Nomenclature and Units

The complete Latin name (genus, species, authority, together with cultivar, strain or culture number where appropriate) should be cited for every organism at first mention. Thereafter the generic name may be abbreviated to the initial except where this could cause confusion. No further abbreviation is permitted.

Nomenclature of Microorganisms. Follow approved bacterial nomenclature to be found online at <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>. Bacterial names with standing in nomenclature can be found online at <http://www.bacterio.cict.fr>. To use a name without

standing in nomenclature, write the name in quotation marks at first citation within the text and within the title and abstract, and include an explanation within the text.

Genetic Nomenclature. Standard genetic nomenclature is to be used and any deviations should be endorsed by an appropriate authoritative body.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by \exp . Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.

- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications that can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. If you are working with LaTeX and have such features embedded in the text, these can be left. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source

publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have a standard template available in key reference management packages. This covers packages using the Citation Style Language, such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and also others like EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to word processing packages which are available from the above sites, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style as described in this Guide. The process of including templates in these packages is constantly ongoing. If the journal you are looking for does not have a template available yet, please see the list of sample references and citations provided in this Guide to help you format these according to the journal style.

If you manage your research with Mendeley Desktop, you can easily install the reference style for this journal by clicking the link below:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/anaerobe>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice. For more information about the Citation Style Language, visit <http://citationstyles.org>.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (J Am Med Assoc 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <http://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For reproduction in black-and-white, please supply black-and-white versions of the figures for printing purposes.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

ANEXO C- **Tabela 1** - Sequência de oligonucleotídeos dos iniciadores para detecção dos microrganismos estudados.

Microrganismo	Oligonucleotídeos	TA ¹
Domínio <i>Archaea</i>	5'-TCCAGGCCCTACGGG-3' 5'-YCCGGCGTTGAMTCCAATT-3'	53°C
Família <i>Enterobacteriaceae</i>	5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G-3' 5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3'	50°C
Família <i>Pseudomonadaceae</i>	5'- GAC GGG TGA GTA ATG CCT A-3' 5'- CAC TGG TGT TCC TTC CTA TA-3'	54°C
<i>E. corrodens</i>	5' CTA ATA CCG CAT ACG TCC TAA 3' 5' CTA CTA AGC AAT CAA GTT GCC C 3'	45°C
<i>P. gingivalis</i>	5' AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG 3' 5' ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT 3'	60°C
<i>P. intermedia</i>	5' TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG 3' 5' TCA ACA TCT CTG TAT CCTGCG T 3'	55°C
<i>P. nigrescens</i>	5' ATG AAA CAA AGG TTT TCC GGT AAG 5' CCC ACG TCT CTG TGG GCT GCG 3'	55°C
<i>T. forsythia</i>	5' GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA 3' 5' TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T 3'	60°C
<i>T. denticola</i>	5' AAG GCG GTA GAG CCG CCG CTC A 3' 5' AGC CGC TGT CGA AAA GCC CA 3'	55°C
<i>C. rectus</i>	5'- TTT CGG AGC GTA AAC TCC TTT TC-3' 5'- TTT CTG CAA GCA GAC ACT CTT-3'	55°C
Universal	5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTG AG-3' 5'- ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT-3'	55°C

¹Temp. Anel. = Temperatura de anelamento do primer DNA da amostra;

2pb = pares de bases que quantificam o tamanho do amplicon formado

ANEXO D - **Tabela 2** – Gênero, idade, diagnóstico clínico e uso de medicações nos pacientes internados em unidade de terapia intensiva (UTI).

Gênero	n	%
Feminino	60	38,5
Masculino	96	61,5
TOTAL	156	100

Uso de Antimicrobiano	n	%
Em uso	6	5,3
Outros	107	94,7
TOTAL	113	100

Diagnóstico	n	%
HIV+	133	85,25
Não HIV+	16	10,25
Sepse	7	4,5
TOTAL	156	100

Uso de Retroviral	n	%
Antirretrovirais	107	82,3
Nenhum	23	17,7
TOTAL	130	100

ANEXO E - Tabela 3 – Ocorrência^a dos microrganismos bucais em pacientes internados em unidade de terapia intensiva.

Microrganismo	Sítios avaliados N ^b (%) ^c							
	Saliva	Mucosa	Sangue	Urina	Aspirado Brônquico	Dreno	Prótese	
	N^d	145	146	13	14	15	0	46
<i>P. gingivalis</i>	HIV+	12 (8,3)	18 (12,3)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(4,3)
	Não-HIV+	3 (2,0)	2 (1,4)	0(0,0)	0(0,0)	1(7,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	1(0,7)	3 (2,0)	0(0,0)	1(7,1)	1(7,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	16(11,0)	23 (15,7)	0 (0,0)	1(7,1)	2(14,0)	0(100)	2(3,3)
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
<i>T. denticola</i>	HIV+	5(3,4)	12(8,2)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(2,1)
	Não-HIV+	2(1,4)	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	6(37,5)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(12,5)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	7(4,8)	13(8,8)	0(0,0)	0(0,0)	8(50,0)	0(0,0)	1(2,1)
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
<i>T. forsythia</i>	HIV+	67(46,2)	62(42,5)	1(7,1)	0(0,0)	1(6,3)	0(0,0)	19(40,4)
	Não-HIV+	1(6,3)	1(0,6)	1(7,1)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	2(1,4)	2(1,4)	2(14,3)	0(0,0)	3(18,8)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	70(54,0)	65(44,5)	4(28,5)	0(0,0)	4(25,1)	0(0,0)	19(40,4)
	N^d	145	146	15	16	17	2	47
<i>P. nigrescens</i>	HIV+	3(2,0)	7(4,8)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Não-HIV+	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	1(6,3)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	4(2,6)	7(4,8)	0(0,0)	1(6,3)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
<i>P. intermedia</i>	HIV+	0(0,0)	3(2,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(2,1)
	Não-HIV+	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(12,5)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	0(0,0)	0(0,0)	1(7,1)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	1(0,6)	3(2,0)	1(7,1)	0(0,0)	2(12,5)	0(0,0)	1(2,1)
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
<i>E. corrodens</i>	HIV+	2(1,4)	3(2,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(4,5)
	Não-HIV+	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	4(25,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	0(0,0)	0(0,0)	1(7,1)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	2(1,4)	3(2,0)	1(7,1)	0(0,0)	4(25,0)	0(0,0)	2(4,5)
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
<i>C. rectus</i>	HIV+	22(15,2)	13(9,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	6(12,8)
	Não-HIV+	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(12,5)	0(0,0)	1(2,1)
	Sepse	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	22(15,2)	13(9,0)	0(0,0)	0(0,0)	2(12,5)	0(0,0)	7(14,9)

^aNúmero de amostras positivas, por sítio e por microrganismos, de acordo com o diagnóstico.

^bNúmero de amostras positivas, no sítio, de acordo com o diagnóstico.

^cPorcentagem de amostras positivas em relação ao número total de amostras por sítio, de acordo com o diagnóstico (nHIV+=133, nNão-HIV+=16, nSepse=07)

^dTotal de amostras válidas (positivas e negativas) no sítio

^eTotal de amostras válidas no sítio, somando-se os três diagnósticos.

^fPorcentagem de amostras positivas do total de amostras válidas.

ANEXO F - Tabela 4 – Ocorrência^a de microrganismos exógenos em pacientes internados em unidade de terapia intensiva.

Microorganismo		Sítios avaliados N ^b (%) ^c						
		Saliva	Mucosa	Sangue	Urina	Aspirado Brônquico	Dreno	Prótese
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
Família <i>Pseudomonadaceae</i>	HIV+	3(2,0)	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Não-HIV+	0(0,0)	2(1,4)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	0(0,5)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	3(2,0)	3(2,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
<i>P. aeruginosa</i>	HIV+	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Não-HIV+	0(0,0)	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	TOTAL ^e (%) ^f	0(0,0)	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
Família <i>Enterobacteriaceae</i>	HIV+	2(1,4)	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	3(6,4)
	Não-HIV+	1(0,6)	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	2(12,5)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Total ^e (%) ^f	4(2,6)	2(1,2)	0(0,0)	0(0,0)	2(12,5)	0(0,0)	3(6,4)
	N^d	145	146	14	15	16	1	47
Domínio <i>Archaea</i>	HIV+	2(1,4)	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(2,1)
	Não-HIV+	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	Sepse	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)
	TOTAL ^e (%) ^f	2(1,4)	1(0,6)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	0(0,0)	1(2,1)

^aNúmero de amostras positivas, por sítio e por microrganismos, de acordo com o diagnóstico.

^bNúmero de amostras positivas, no sítio, de acordo com o diagnóstico.

^cPorcentagem de amostras positivas em relação ao número total de amostras por sítio, de acordo com o diagnóstico (nHIV+=133, nNão-HIV+=16, nSepse=07)

^dTotal de amostras válidas (positivas e negativas) no sítio

^eTotal de amostras positivas no sítio, somando-se os três diagnósticos.

^fPorcentagem de amostras positivas do total de amostras válidas.

