

SILVIA MARIA RODRIGUES QUERIDO

**MICROORGANISMOS SUPERINFECTANTES NA CAVIDADE
BUCAL DE INDIVÍDUOS SUBMETIDOS A
ANTIBIOTICOTERAPIA PARA TRATAMENTO DE
TUBERCULOSE PULMONAR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

SILVIA MARIA RODRIGUES QUERIDO

**MICROORGANISMOS SUPERINFECTANTES NA CAVIDADE
BUCAL DE INDIVÍDUOS SUBMETIDOS A
ANTIBIOTICOTERAPIA PARA TRATAMENTO DE
TUBERCULOSE PULMONAR**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo Programa de Pós-graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Concentração em Biopatologia Bucal.

Orientador Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

São José dos Campos
2006

DEDICATÓRIA

À Deus, todos os dias de minha vida.

Aos meus pais,

Adilson e Cecília,

sempre presentes e confiantes na concretização de meus sonhos.

Queiram me desculpar pela ausência freqüente, pelo mau humor de tantas horas...

Agradeço a vocês por me ensinarem a superar desafios e desatar nós, e pelo amor incondicional que me guia nas mais difíceis jornadas.

À vocês, todo o meu amor e a minha gratidão.

À minha família, pelo carinho, apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

À querida Vera, pelo amor e dedicação, desde a minha infância, em todos os momentos.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao Professor Antonio Olavo Cardoso Jorge,

Pela orientação competente e dedicada,

Pela confiança em mim depositada,

Pela oportunidade de crescimento científico,

*Pelo exemplo constante de seriedade, trabalho, honestidade, serenidade e
paciência,*

Toda a minha gratidão e minha admiração.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. Paulo Villela Santos Júnior e do vice-diretor Prof. José Roberto Rodrigues.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora Profa. Adj. Rosilene Fernandes da Rocha.

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal.

À Profa. Dra. Cristiane Yumi Koga Ito, pela dedicação, pela amizade e pela paciência sempre.

À Profa. Dra. Juliana Campos Junqueira, pelo convívio fraterno, pela amizade e dedicação.

À CAPES pela concessão de bolsa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão do Auxílio à Pesquisa que possibilitou a aquisição dos materiais necessários para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra Maria Stella Amorim da Costa Zöllner, ao Dr. José Paulo Pereira, diretor do Departamento de Saúde, e ao Dr. Daniel Bueno, chefe da divisão de Saúde Bucal do Departamento de Saúde da Prefeitura Municipal de Taubaté, pela possibilidade de realização deste trabalho no Ambulatório de Tisiologia desta instituição.

Ao Dr. Jerson Carvalho e à enfermeira Nairdes da Silva Valério do Ambulatório de Tisiologia da Policlínica II da Prefeitura Municipal de Taubaté.

À Dra. Nadia Maria Magalhães Meireles, diretora técnica do Departamento de Saúde da DIR XXIV.

À Dra. Maria Helena Magalhães Rezende e à enfermeira Sandra Regina Sangar Prado Pereira do Ambulatório Regional de Especialidades de Taubaté.

À colega Mônica César do Patrocínio pelo auxílio na coleta das amostras dos indivíduos do grupo controle no Posto de Atendimento Médico Odontológico do Belém da Prefeitura Municipal de Taubaté.

À Profa. Dra. Silvana Soléo Ferreira dos Santos, pela disponibilidade, dedicação e imensa colaboração no ensino da identificação dos microrganismos com o sistema API.

Aos Auxiliares de Ensino, Ivan da Silva Faria e Jane Rose Dias Dionísio Rodrigues, e à técnica Tânia Cristina Sumita do Laboratório de Microbiologia da Universidade de Taubaté.

Às secretárias da Seção de Pós-graduação Rosemary de Fátima Salgado, Erena Michie Hasegawa, Maria Aparecida Consiglio de Souza e Lilian Faria das Graças, pela atenção dispensada.

À assistente administrativa do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal, Silvia Scarpel, pela atenção e dedicação e pela formatação da estrutura do trabalho final.

À bibliotecária Ângela de Brito Bellini pela revisão da estrutura do trabalho.

Ao Carlos Guedes, pela colaboração referente ao processo FAPESP.

À Maria de Fátima Pires, funcionária do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal.

Ao estatístico e amigo Fernando Elias Claro, pela paciência e análise criteriosa dos resultados.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia, especialmente à Patrícia Monteiro Ribeiro pela amizade, pelo convívio, pelos conselhos, pelas risadas que tornaram mais leve essa caminhada, e ao Edson Yukio Komiyama, pela companhia sempre, pela experiência compartilhada e pela ajuda nos momentos difíceis.

À Graziella Nuernberg Back Brito, que se tornou uma amiga tão especial, pela companhia constante, por tudo que aprendemos juntas, pela dedicação e seriedade em todos os procedimentos laboratoriais, que possibilitaram a realização deste trabalho, pelos sorrisos e lágrimas, por compartilhar alegrias e tristezas, ansiedades, vitórias e derrotas.

A todos os indivíduos que gentilmente aceitaram participar desta pesquisa.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO.....	11
1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1 Aspectos gerais da tuberculose.....	14
2.2 Aspectos epidemiológicos da tuberculose.....	17
2.3 Tratamento da tuberculose.....	22
2.4 Microrganismos superinfectantes na cavidade bucal.....	29
2.5 Microrganismos superinfectantes e doença periodontal...	37
2.6 Gênero <i>Candida</i>.....	42
2.7 Gênero <i>Staphylococcus</i>.....	48
2.8 Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae.....	55
2.8.1 Enterobacteriaceae.....	55
2.8.2 Pseudomonadaceae.....	59
3 PROPOSIÇÃO.....	63
4 MATERIAL E MÉTODO.....	64
4.1 População estudada	64
4.1.1 Grupo Tuberculose.....	64
4.1.2 Grupo Controle.....	64
4.1.3 Anamnese e exame clínico.....	65
4.2 Coleta e processamento das amostras.....	65
4.3 Identificação das amostras de <i>Candida</i>.....	67
4.3.1 Formação de tubo germinativo.....	68
4.3.2 Microcultivo.....	68
4.3.3 Fermentação de carboidratos.....	68

4.3.4 Assimilação de carboidratos.....	69
4.4 Identificação das amostras de <i>Staphylococcus</i>.....	72
4.4.1 Produção da enzima catalase.....	72
4.4.2 Produção da enzima coagulase.....	73
4.4.3 Identificação das amostras de estafilococos coagulase-positivas.....	74
4.4.4 Identificação das amostras de estafilococos coagulase-negativas.....	77
4.5 Identificação das amostras de Enterobactérias e <i>Pseudomonas</i>.....	81
4.6 Análise Estatística.....	83
5 RESULTADOS	84
5.1 População estudada	84
5.2 Gênero <i>Candida</i>	88
5.3 Gênero <i>Staphylococcus</i>	93
5.4 Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae	100
6 DISCUSSÃO	106
6.1 População estudada	106
6.2 Gênero <i>Candida</i>	109
6.3 Gênero <i>Staphylococcus</i>	111
6.4 Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae	114
7 CONCLUSÕES	119
8 REFERÊNCIAS	120
ANEXOS	146
APÊNDICE.....	151
ABSTRACT.....	157

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS/SIDA = Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

BCG = Bacilo de Calmette-Guérin

C = grupo controle

CD4 = *clusters of differentiation 4*

Cel = célula

CIM = Concentração Inibitória Mínima

Cl = Clamidoconídeo

CVE = Centro de Vigilância Epidemiológica

DOTS = *Directly Observed Treatment Short*

EMB = Etambutol

Fator R = fator de resistência

FUNASA = Fundação Nacional de Saúde

GA = galactose

Gl = glicose

Hf = hifa

HIV = Vírus da Imunodeficiência Humana

Ig = imunoglobulina

INH = isoniazida

L = lactose

M = maltose

mL = mililitro

mm = milímetro

μm = micrômetro

OMS = Organização Mundial de Saúde

PNCT = Programa Nacional de Controle da Tuberculose

pH = concentração hidrogênio-iônica

PZA = pirazinamida

RMP = rifampicina

S = sacarose

SM = estreptomicina

spp. = espécies

TB = tuberculose

TG = Tubo Germinativo

TSA = meio de cultura *Tryptic Soy Agar*

UFC = unidade formadora de colônia

V = Volume

VP = Voges-Proskauer

WHO = World Health Organization

QUERIDO, S. M. R. **Microrganismos superinfectantes na cavidade bucal de indivíduos submetidos a antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar.** 2006. 157f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

RESUMO

Superinfecção resulta no desenvolvimento de patógenos residentes prejudiciais ou oportunistas em consequência de alteração da microbiota benéfica e pode representar uma complicação na terapia antimicrobiana. O presente estudo avaliou a presença de leveduras, estafilococos, enterobactérias e *Pseudomonas* na cavidade bucal e sulco gengival de indivíduos submetidos à terapia antibiótica para tratamento de tuberculose pulmonar e indivíduos controle. Foram incluídos cinquenta indivíduos diagnosticados com tuberculose pulmonar e que estivessem sob antibioticoterapia por um período mínimo de 45 dias e máximo de seis meses. Para controle foram incluídos indivíduos sistemicamente saudáveis. A coleta de material da cavidade bucal foi realizada pela técnica de enxágüe bucal e do sulco gengival utilizando-se cones de papel absorvente esterilizados. As amostras coletadas foram semeadas em duplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, ágar Manitol e ágar MacConkey. As amostras de *Candida* spp. e de estafilococos coagulase-positivas foram identificadas por provas bioquímicas específicas e as amostras de estafilococos coagulase-negativas, enterobactérias e *Pseudomonas* foram identificadas utilizando-se o sistema API. Os resultados foram analisados pelo teste estatístico de Mann-Whitney ($p < 0,05$). *Candida* spp. foram detectadas em número significativamente maior na cavidade bucal de indivíduos com tuberculose pulmonar em relação aos controles, sendo *C. albicans* mais prevalente em ambos os grupos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para *Staphylococcus* spp., enterocatórias e *Pseudomonas*. Concluiu-se que os indivíduos sob antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar apresentaram maior prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal em relação aos controles.

PALAVRAS-CHAVE: Tuberculose pulmonar; super-infecção; bactérias; fungos; *Candida*; boca; humano; “in vivo”.

1 INTRODUÇÃO

A tuberculose é uma doença infecciosa crônica, causada por *Mycobacterium tuberculosis* e outras espécies patogênicas de micobactérias.

A doença continua sendo importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento. Atualmente, considera-se que são responsáveis pelo aumento da endemia tuberculosa no mundo, a infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o uso de drogas injetáveis, o aumento da pobreza, o aumento do número de desabrigados, a migração, a má nutrição e a urbanização (NATAL¹¹³, 1998).

A persistência da tuberculose em escala internacional, a despeito da existência de estratégias terapêuticas eficazes, revela não apenas a diversidade de fatores envolvidos na sua determinação, mas sobretudo, a complexidade do seu controle (HOPEWELL⁶⁸, 2002).

M. tuberculosis e outras micobactérias patogênicas podem sofrer mutações e desenvolver resistência ao regime de medicação com um único fármaco. Em função disso, o tratamento de escolha baseia-se na terapia com múltiplos agentes antimicrobianos por um período de seis a doze meses (WHO¹⁸⁰, 2003).

Existem evidências de que o uso prolongado de antibióticos pode estar relacionado com alterações da microbiota bucal e possível aumento na ocorrência de microrganismos oportunistas. Superinfecções são novas infecções que dificultam o tratamento de um processo pré-existente, podendo representar uma complicação da terapia antimicrobiana pela alteração da microbiota benéfica, causando um

supercrescimento de patógenos potencialmente prejudiciais ou oportunistas (VAN WINKELHOFF et al.¹⁷⁰, 1996). Bacilos entéricos, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e leveduras foram descritos como microrganismos superinfectantes (SLOTS et al.¹⁵⁵, 1988; FLYNN & SLOTS⁴⁴, 1993).

A incidência de *Candida* spp. na cavidade bucal e as razões para o estabelecimento de infecções causadas por esses microrganismos podem estar relacionadas com imunossupressão, desordens endócrinas, lesões em mucosas, higiene bucal deficiente e tratamento prolongado com antibióticos e corticosteróides. Alterações no sistema imune e na microbiota normal são fatores que usualmente precedem a colonização, infecção e doenças produzidas por leveduras (RAMIREZ-AMADOR et al.¹³⁰, 1997).

Microrganismos do gênero *Pseudomonas*, bacilos entéricos e estafilococos não são considerados residentes na microbiota bucal humana, entretanto podem atuar como patógenos oportunistas em indivíduos submetidos à administração sistêmica prolongada de antimicrobianos ou imunossupressores. Quando presentes encontram-se em números reduzidos e são considerados como parte da microbiota transitória. Entretanto, a administração sistêmica prolongada de antimicrobianos ou imunossupressão podem promover um aumento desses microrganismos (SLOTS et al.¹⁵⁵, 1988; DAHLÉN & WIKSTRÖM³², 1995).

Diante do exposto, acreditamos ser de grande valia a avaliação da ocorrência de microrganismos oportunistas na cavidade bucal e sulco gengival de indivíduos submetidos a antibioticoterapia utilizada para tratamento de tuberculose pulmonar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da tuberculose

A tuberculose esteve presente durante todo o desenvolvimento da história humana. Existem evidências de tuberculose desde os tempos pré-históricos, encontradas em múmias do antigo Egito e, mais recentemente, em uma múmia pré-colombiana no Peru. Em 1882, o pesquisador alemão Robert Koch conseguiu isolar o bacilo da tuberculose, que ficou conhecido como bacilo de Koch e posteriormente foi denominado *Mycobacterium tuberculosis*. Antes do conhecimento do agente causador, vários métodos de tratamento como clima, isolamento em sanatórios, colapsoterapia (especialmente o pneumotórax terapêutico), sais de ouro, de cobre e outros foram instituídos sem sucesso, assim como o uso da tuberculina, descoberta pelo próprio Robert Koch, que chegou a anunciar a sua descoberta como cura definitiva. Sessenta e dois anos depois, em 1944, foram descobertos os primeiros medicamentos capazes de eliminar o bacilo da tuberculose (SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA¹⁵⁸, 2004).

Apesar do otimismo das décadas de sessenta e setenta concernente a possibilidade de controle, a tuberculose ressurgiu como um importante problema de saúde pública mundial. Desde 1993 a Organização Mundial de Saúde decretou a tuberculose como enfermidade reemergente (CHAIMOWICZ²³, 2001).

A tuberculose acomete os pulmões em cerca de 90% dos casos, mas pode manifestar-se também como tuberculose meníngea, miliar, óssea, renal, cutânea, genital e linfática, sendo a forma pulmonar a mais contagiosa (BRASIL¹⁵, 2004).

A via aérea é a principal via de transmissão da tuberculose pulmonar, sendo que a fala, o espirro e, principalmente, a tosse de um indivíduo com tuberculose pulmonar bacilífera libera no ar gotículas, de tamanhos variados, contendo no seu interior os bacilos. As gotículas mais pesadas depositam-se rapidamente no solo, enquanto que as mais leves podem permanecer em suspensão por diversas horas. Somente os núcleos secos das gotículas (núcleo de Wells), com diâmetro de até 5 µm e com um a dois bacilos em suspensão, podem atingir os bronquíolos e alvéolos, e iniciar a multiplicação. As gotículas médias são, na sua maioria, retidas pela mucosa do trato respiratório superior, e removidas dos brônquios, através do mecanismo muco-ciliar. Os bacilos assim removidos são deglutidos, inativados pelo suco gástrico e eliminados nas fezes. Os bacilos que se depositam em objetos dificilmente se dispersarão em aerossóis e, por isso, não desempenham papel importante na transmissão da doença (BRASIL¹⁴, 2002).

Os sintomas mais constantemente relatados, em ordem decrescente, são tosse, febre, sudorese, expectoração, emagrecimento, dispnéia, dor torácica e hemoptise. A grande frequência do sintoma tosse reforça a indicação do estudo baciloscópico de escarro para todos os indivíduos sintomáticos respiratórios como recomenda o Programa Nacional para o Controle da Tuberculose (JOB et al.⁷¹, 1986).

Todo programa de saúde pública, especialmente os de controle da tuberculose, visa inicialmente à quebra da cadeia de transmissão da doença, pois sabe-se que cada doente não descoberto tende a infectar de dez a 15 pessoas em um ano, sendo que uma ou duas desenvolvem a doença, fazendo com que a mesma permaneça na população como endemia (BRASIL¹⁴, 2002).

A maioria dos novos casos de doença pulmonar ocorre em torno de 12 meses após a infecção inicial. A probabilidade de o indivíduo vir a ser infectado, e de que essa infecção evolua para a doença, depende de múltiplas causas, destacando-se, dentre estas, as condições sócio-econômicas e algumas condições médicas (diabetes mellitus, silicose, uso prolongado de corticosteróides ou outros imunossupressores, neoplasias, uso de drogas e infecção por HIV). A evolução do quadro clínico dependerá do indivíduo estar sendo infectado pela primeira vez (primo-infecção), ou reinfectado (reinfecção exógena). A probabilidade de adoecer numa primo-infecção depende da virulência do bacilo, da fonte infectante e das características genéticas dos indivíduos infectados (BRASIL¹⁴, 2002).

Quanto mais rápido for o diagnóstico, mais precocemente se poderá iniciar a quimioterapia específica, conseguindo-se assim, além de se evitar a transmissão, diminuir as seqüelas da doença e manter o indivíduo como força de trabalho atuante (JOB et al.⁷¹, 1986). Sabe-se que a quimioterapia suprime a contagiosidade da doença, nas primeiras duas semanas, em oitenta a 95% dos casos (WHO¹⁷⁸, 1999).

A mortalidade por tuberculose apresentou tendência crescente em muitos países desde a eclosão da epidemia da doença devido ao HIV, ocorrida na década de oitenta (ANTUNES & WALDMAN⁷, 1999). Esse aumento deveu-se também, dentre outros fatores, às modificações nos programas de controle e assistência e ao crescimento da população (DYE et al.³⁹, 1999). No entanto, apesar do aumento evidenciado, a importância da tuberculose na mortalidade de populações não se reflete nas estatísticas apresentadas segundo a causa básica de morte. A tuberculose ocorre como causa associada em uma grande proporção de óbitos em que a morte é atribuída à outra causa básica diversa (SANTO et al.¹⁴⁴, 2003).

A co-infecção da tuberculose e da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS/SIDA) constitui-se em importante fator

de mortalidade prematura. Em 1998, no estado de São Paulo, a tuberculose foi mencionada como causa associada de morte em 19,6% dos óbitos devido à AIDS (SANTO et al.¹⁴³, 2000). Esses mesmos autores em 2003 estudaram a mortalidade relacionada à tuberculose no estado de São Paulo, segundo causas múltiplas de morte e relataram que os óbitos em que a tuberculose foi mencionada como causa associada teve como causa básica a AIDS (65,3%).

A associação entre AIDS e tuberculose pode ocorrer pela reativação desta última, pela rápida progressão de uma infecção primária e por reinfecção (exógena) em qualquer estágio de infecção por HIV. O risco de primo-infecção e reinfecção entre indivíduos infectados por HIV é consideravelmente elevado. A progressão do curso da doença por HIV é agravada pela tuberculose. A co-infecção por HIV e tuberculose dobra o risco de morte em relação aos infectados apenas por HIV (SANTO et al.¹⁴⁴, 2003).

As formas clínicas da tuberculose do sistema nervoso e tuberculose miliar são encontradas com maior frequência em indivíduos infectados por HIV do que em indivíduos não infectados. A tuberculose do sistema nervoso central ocorre em 5% a 10% dos indivíduos infectados por HIV (SHAFER & EDLIN¹⁵¹, 1996).

2.2 Aspectos epidemiológicos da tuberculose

A tuberculose, doença infecto-contagiosa, acomete o homem há milênios, como demonstram os esqueletos fósseis de seres humanos com lesões ósseas compatíveis com essa enfermidade encontrados em várias regiões e datados até de cinco mil a.C. Um declínio da doença foi observado desde o século XX, especialmente a

partir da introdução de antimicrobianos efetivos na década de 1950. Entretanto, este declínio cessou abruptamente, no início da década de oitenta, com o surgimento da AIDS/SIDA (BRASIL¹⁴, 2002).

A magnitude do problema no início da década de noventa se expressava em estimativas de ocorrência de cerca de 7,5 milhões de casos e uma taxa de notificação de 74,6 por cem mil habitantes. Também a mortalidade mundial estimada era de 48 por cem mil habitantes em 1990, sendo que 98% desses casos teriam ocorrido nos países subdesenvolvidos (RAVIGLIONE et al.¹³⁴, 1996). Em resposta a essa situação, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considerou a tuberculose como uma emergência global em 1993 e formulou a estratégia que ficou conhecida como DOTS (*Directly Observed Treatment Short*), que combina o tratamento de curta duração com medidas políticas, organizacionais e de vigilância (WHO¹⁷⁸, 1999).

Contudo, apesar dos progressos registrados e da eficácia da estratégia adotada, dos 179 países que notificaram casos de tuberculose, apenas 46% estavam implementando a estratégia DOTS e somente 27% dos casos notificados estavam sendo submetidos ao DOTS (DYE et al.³⁸, 2002). Por esses motivos, em 2000 a Assembléia da OMS convocou diversas instituições para participar da ação denominada *Parceria Global para Deter a Tuberculose* (LEE et al.⁹¹, 2002).

Estima-se que cerca de 1,7 bilhões de indivíduos em todo o mundo estejam infectados por *M. tuberculosis*, correspondendo a 30% da população mundial. Nos países desenvolvidos, cerca de quarenta mil casos novos são descobertos a cada ano. Nos países em desenvolvimento, estima-se que ocorreram cerca de 2,8 milhões de mortes por tuberculose e 7,5 milhões de casos novos (WHO¹⁷⁹, 2002).

No Brasil, estima-se que, do total da população, 35 a 45 milhões de pessoas estão infectadas por *M. tuberculosis*, com aproximadamente cem mil casos novos por ano e quatro a cinco mil mortes anualmente. O Brasil apresenta número mais elevado de casos da

América Latina (53,4 novos casos por cem mil habitantes), sendo o sexto país do mundo com maior incidência de tuberculose. A associação (HIV/TB) constitui, nos dias atuais, um sério problema de saúde pública, podendo levar ao aumento da morbidade e mortalidade por tuberculose, em muitos países (BRASIL¹⁴, 2002).

A mortalidade por tuberculose no Brasil começou a cair abruptamente a partir da década de cinquenta com o advento da quimioterapia, tendo-se verificado a redução da velocidade de decréscimo nas décadas seguintes. Nas capitais brasileiras este decréscimo foi de 61,4% entre 1970-1979, havendo um declínio médio de 10% ao ano, com coeficientes de mortalidade mais elevados nas regiões Norte e Nordeste. Entre 1977 e 1987, o percentual de redução foi de 51,7% ou seja, em média 5,4% ao ano. A taxa de incidência sofreu redução de 63,4 por cem mil habitantes em 1981 para 48,2 por cem mil habitantes em 1990, mantendo-se nesse patamar em 1999 (RUFFINO-NETTO¹³⁷, 2002).

Mota et al.¹⁰⁹ (2003), em estudo descritivo da mortalidade por tuberculose em Salvador nos anos de 1991, 1994 e 1997, revelaram que os riscos de morte por essa causa representaram cerca do dobro daqueles verificados no Brasil no mesmo período, sendo que para alguns distritos essa relação foi de cinco vezes. Os distritos que possuíam os coeficientes mais elevados abrangeram áreas situadas na periferia da cidade, onde grande parte das famílias habitava em condições de vida precárias, o que possivelmente tornou os indivíduos mais expostos e mais susceptíveis a infecções como a tuberculose.

Estudos têm demonstrado tendência à transição etária da incidência de tuberculose no Brasil de adultos para idosos (ANTUNES & WALDMAN⁷, 1999; CHAIMOWICZ²³, 2001; MOTA et al.¹⁰⁹, 2003). Esse fato tem sido atribuído tanto a fatores demográficos relacionados ao envelhecimento da população, quanto à influência de programas de controle e da infecção por HIV. Com o envelhecimento da população, indivíduos que tiveram primo-infecção nas primeiras décadas do século

XX, na terceira idade podem voltar a ficar susceptíveis. Por apresentarem quadros clínicos atípicos, esses indivíduos não são facilmente diagnosticados o que aumenta a mortalidade entre os idosos. Por outro lado, na medida em que a transmissão da tuberculose é reduzida, ocorre diminuição no risco de infecção e não no de reativação de lesões anteriores o que também contribui para o desvio para as faixas etárias mais elevadas (CHAIMOWICZ²³, 2001).

A progressão da integração dos povos indígenas à sociedade fez com que a incidência de tuberculose entre os índios seja significativamente maior do que a encontrada na população não indígena. De fato, a população indígena do Estado de Mato Grosso do Sul contribuiu com cerca de 30% dos casos de tuberculose, sendo que a etnia com maior incidência foi a dos Guarani-Kaiwá, moradores da região sul do Estado, com uma população estimada de vinte e dois mil e seiscentos indivíduos e cento e sessenta casos por ano em média, o que significa uma taxa de incidência anual de setecentos casos de tuberculose por cem mil habitantes. As características culturais dos indígenas exigem que o tratamento da tuberculose nessas populações mereça cuidados especiais, dado o risco elevado do abandono e, conseqüentemente, de aumento das taxas de prevalência da doença e de surgimento de casos de tuberculose multirresistente (MARQUES & CUNHA⁹⁵, 2003).

Os casos novos de tuberculose por forma clínica registrados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo no período de 2000 a 2005 (atualizados até março de 2006) estão representados no quadro a seguir:

Quadro 1- Casos novos de tuberculose por forma clínica no período de 2000 a 2005 no Estado de São Paulo* (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO²², 2005).

Ano	Pulmonar	Pulmonar B. Neg.	Pulmonar B. NR	Extra pulmonar	Meníngea	Total
2005	8804	2862	2038	2880	245	16829
2004	8846	3096	2067	2981	229	17219
2003	8907	3046	2127	2990	272	17342
2002	9074	3049	2327	3029	275	17754
2001	9026	3128	2401	2930	238	17723
2000	9190	3461	2421	2870	243	18185

* dados atualizados até março/2006

Pulmonar B. Neg.: Pulmonar com baciloscopia negativa.

Pulmonar B. NR: Pulmonar baciloscopia não realizada.

O Brasil encontra-se entre os 22 países que concentram 80% dos casos estimados no mundo. Em 2002 foram notificados 97.875 casos, sendo 81.034 casos novos. A maior taxa de incidência tem ocorrido no estado do Rio de Janeiro, porém, em todas as unidades federativas existem municípios, especialmente em áreas metropolitanas e periféricas das grandes cidades, em que a tuberculose tem taxas altíssimas. O gênero masculino tem sido o mais atingido na proporção de dois para um. Algumas populações como as indígenas, carcerárias e sem-teto apresentam incidência muito maior que a população geral (HIJJAR⁶⁵, 2005).

No Rio de Janeiro, observa-se a maior taxa de mortalidade (7,0/100 mil habitantes) e em Santa Catarina a menor (1,0/100 mil habitantes). A associação com o HIV tem sido alta em muitos estados como o Rio Grande do Sul, em torno de 30%, justificando a indicação do teste para detecção do HIV em todo paciente com tuberculose (HIJJAR⁶⁵, 2005).

Souza et al.¹⁶³ (2005) analisaram a ocorrência de tuberculose em Olinda no estado de Pernambuco, entre os anos de 1996 e 2000. Os autores relataram uma elevada incidência de tuberculose durante o período avaliado, com média de 111 casos por cem mil habitantes. Observou-se a existência de famílias com mais de um caso de tuberculose e a presença de casos de retratamento.

2.3 Controle da tuberculose

A prevenção da tuberculose é realizada com a vacina BCG (Bacilo de Calmette-Guérin), preparada a partir de uma cepa derivada do *Mycobacterium bovis* atenuada. A vacina BCG confere poder protetor às formas graves de tuberculose, decorrentes a primo-infecção. No Brasil, é prioritariamente indicada para crianças de zero a quatro anos de idade, sendo obrigatória para menores de um ano, como dispõe a portaria nº 452, de 06/12/1976, do Ministério da Saúde (BRASIL¹⁴, 2002).

A estratégia de controle da tuberculose tem sido elaborada por programas governamentais. Estes consistem, basicamente, em diagnosticar e tratar os casos de tuberculose o mais rapidamente possível, a fim de interromper a transmissão e evitar a difusão da doença.

Embora o tratamento de curta duração (seis meses) tenha sido adotado desde 1979 e a supervisão do mesmo tivesse ocorrido localizadamente, apenas em 1998 com o Programa Nacional de Controle da Tuberculose, é que a OMS considerou que o país tinha aderido à estratégia DOTS (WHO¹⁷⁹, 2002). O objetivo do Programa Nacional de Controle da Tuberculose (PNCT) é localizar no mínimo 70% dos casos estimados anualmente para tuberculose e curar no mínimo 85% destes. O PNCT é uma das prioridades do Ministério da Saúde e conta, atualmente,

com o maior investimento dos últimos dez anos, sendo que até o ano de 2007 deverão ser aplicados R\$ 119,5 milhões (BRASIL¹⁵, 2004).

A estratégia DOTS visa o aumento da adesão dos indivíduos ao tratamento, maior descoberta das fontes de infecção (indivíduos pulmonares bacilíferos), e o aumento da cura, reduzindo-se o risco de transmissão da doença na comunidade, tendo como elemento central o Tratamento Supervisionado (WHO¹⁸⁰, 2003). Os cinco elementos da estratégia DOTS são:

- a) compromisso político com a implementação do programa de controle da tuberculose;
- b) detecção de casos, por meio de baciloscopia de escarro, entre sintomáticos respiratórios da demanda dos serviços gerais de saúde;
- c) tratamento padronizado, de curta duração, diretamente observado e monitorado quanto à sua evolução, para todos os casos com baciloscopia de escarro positiva;
- d) provisão regular de medicamentos tuberculostáticos;
- e) sistema de informação que permita avaliar a detecção de casos, o resultado do tratamento de casos individuais e o desempenho de programa.

O Tratamento Supervisionado deve ser priorizado para todos os casos de tuberculose bacilífera. A supervisão da ingestão dos medicamentos deve ser realizada em local de escolha do indivíduo, podendo ser administrada por um trabalhador da saúde ou por um familiar devidamente orientado para essa atividade (WHO¹⁸⁰, 2003). O Tratamento Supervisionado apresenta os seguintes objetivos:

- a) instituir tratamento supervisionado para todos os casos com baciloscopia positiva;
- b) aceitar tratamento auto-administrado para indivíduos com baciloscopia negativa;

- c) realizar baciloscopias de controle;
- d) realizar consultas de acompanhamento;
- e) realizar visita domiciliar.

O agente etiológico da tuberculose é o complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Esse complexo é constituído por *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* e *M. microti*. Outras espécies de micobactérias podem produzir quadro clínico semelhante à tuberculose, sendo necessário para diagnóstico diferencial à cultura e a identificação das mesmas pelos laboratórios de referência. Esses microrganismos podem sofrer mutações e desenvolver resistência ao regime de medicação com um único antimicrobiano. Em função disso, o tratamento de escolha baseia-se na terapia com múltiplos agentes antimicrobianos (BRASIL¹⁴, 2002).

O tratamento da tuberculose consiste em uma associação de fármacos, geralmente isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA), durante dois meses, seguida por quatro meses com INH e RMP indicado para o tratamento de todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar. Para casos de recidiva após cura ou retorno após abandono o tratamento indicado consiste no acréscimo de etambutol ao Esquema Básico. Os Esquemas II e III correspondem a associação indicada para tratamento de tuberculose meningoencefálica e casos de falência do Esquema Básico (Quadro 2) (BRASIL¹⁴, 2002).

Quadro 2- Associações de agentes antimicrobianos e período de tempo utilizados para tratamento da tuberculose (BRASIL¹⁴, 2002).

Fases do Tratamento	Esquema Básico	Esquema Básico + Etambutol	Esquema II	Esquema III
1ª Fase	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida Etambutol	Rifampicina Isoniazida Pirazinamida	Estreptomicina Pirazinamida Etambutol Etionamida
Duração	2 meses	2 meses	2 meses	3 meses
2ª Fase	Rifampicina Isoniazida	Rifampicina Isoniazida Etambutol	Rifampicina Isoniazida	Etambutol Etionamida
Duração	4 meses	4 meses	7 meses	9 meses
Período Total	6 meses	6 meses	9 meses	12 meses

A isoniazida ou hidrazida do ácido isonicotínico (INH) é o mais antigo fármaco sintético efetivo contra tuberculose e um dos principais quimioterápicos de primeira linha no tratamento da doença, sendo reconhecida, já em 1952, como potente agente contra *M. tuberculosis*. A concentração inibitória mínima (CIM) é muito baixa, o que contribui para sua eficácia (0,02-0,05 µg/mL) (MIDDLEBROOK¹⁰³, 1952). O mecanismo de ação da isoniazida, assim como o que confere resistência é complexo e ainda pouco esclarecido. Evidências sugerem que esse fármaco inibe a biossíntese dos ácidos micólicos que compõem a parede celular, tornando a bactéria susceptível aos radicais de oxigênio e a outros fatores do meio (ROSSETTI et al.¹³⁶, 2002).

A rifampicina (RMP), derivado semi-sintético da rifamicina, é extremamente efetiva contra *M. tuberculosis*, com CIM de 0,1 µg/mL

a 0,2 µg/mL, e possui atividade bactericida rápida, eliminando bactérias persistentes. A rifampicina liga-se à subunidade β da RNA polimerase inibindo a transcrição (ROSSETTI et al.¹³⁶, 2002).

A pirazinamida (PZA) é um análogo estrutural da nicotinamida e tem sido usada no esquema primário de tratamento contra tuberculose, juntamente com INH e RMP, nos últimos cinquenta anos. A adição desse fármaco no esquema de tratamento fez com que este fosse reduzido de nove para seis meses (SCORPIO et al.¹⁴⁸, 1997). A PZA apresenta alta atividade em meios ácidos (pH=5,5), o que favorece sua efetividade nos focos inflamatórios de tuberculose, em que geralmente se encontram os bacilos (HEWLETT et al.⁶⁴, 1995). A atividade da pirazinamida é altamente específica contra *M. tuberculosis*, apresentando pouco ou nenhum efeito em outras micobactérias (KONNO et al.⁸⁶, 1959).

O etambutol (EMB) denominado quimicamente de dextro-etilenodiimino-di-1-butanol-dihidroclorido, é amplamente empregado no esquema primário de tratamento da tuberculose. Seu mecanismo de ação está relacionado à inibição da incorporação do ácido micólico, essencial para a formação da parede micobacteriana (SOINI & MUSSER¹⁶², 2001).

A estreptomicina (SM) é um antibiótico aminociclitol glicosídico que interfere na síntese protéica inibindo a tradução de RNA mensageiro, tanto em seu início como na incorporação de novos aminoácidos na cadeia polipeptídica. A CIM para as cepas sensíveis oscila em torno de 8 µg/mL. O mecanismo de resistência bacteriana mais freqüente é a expressão de enzimas modificantes de aminoglicosídeos adquiridos por meio de plasmídeos ou transposons (COLL²⁸, 2003).

Atualmente, o Brasil apresenta 73% de índice de cura dos casos tratados e cerca de 12% de abandono do tratamento (BRASIL – MINISTÉRIO DA SAÚDE¹⁵, 2004). A maioria dos indivíduos submetidos ao tratamento de tuberculose consegue completar o tempo recomendado sem reações adversas relevantes ao uso dos fármacos antituberculose. Todavia, os maiores determinantes dessas reações se referem à dose,

horários de administração da medicação, idade do indivíduo, estado nutricional, alcoolismo, condições da função hepática e renal e co-infecção por HIV (BRASIL¹⁵, 2002).

De acordo com a Fundação Nacional de Saúde (BRASIL¹⁴, 2002) as reações adversas estão representadas, de forma esquemática, no Quadro 3, conforme a classificação: efeitos menores e efeitos maiores. Os efeitos menores ocorrem entre 5% a 20% dos casos, e são assim classificados, porque não implicam em modificação imediata do esquema padronizado; os efeitos maiores são aqueles que implicam interrupção, ou alteração do tratamento e são menos freqüentes, ocorrendo em torno de 2%, podendo chegar a 8%.

Quadro 3- Reações adversas decorrentes do uso de fármacos antituberculose (BRASIL¹⁴, 2002).

Efeitos Menores		Efeitos Maiores	
Efeito	Fármaco	Efeito	Fármaco
Irritação gástrica Epigastralgia e dor abdominal	RMP INH PZA	Exantemas	SM
Artralgia ou artrite	PZA INH	Hipoacusia	SM
Neuropatia periférica	INH EMB	Psicose, crise convulsiva, encefalopatia tóxica e coma	INH
Cefaléia Mudança de comportamento	INH	Neurite ótica	EMB INH
Suor e urina cor de laranja	RMP	Hepatotoxicidade	Todos os fármacos
Prurido cutâneo	INH RMP	Trombocitopenia, leucopenia, eosinofilia, anemia hemolítica, agranulocitose, vasculite	RMP INH
Hiperuricemia	PZA EMB	Nefrite intersticial	RMP
Febre	RMP INH	Rabdomiólise com mioglobinúria e insuficiência renal	PZA

INH: isoniazida; RMP: rifampicina; PZA: pirazinamida; EMB: etambutol; SM: estreptomicina.

Situações como monoterapia, prescrição imprópria dessa associação ou falta de colaboração do paciente para o uso do esquema terapêutico podem levar ao surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes a um ou mais fármacos (ROSSETTI et al.¹³⁶, 2002).

O aumento do número de linhagens multirresistentes (resistentes a, pelo menos, rifampicina e isoniazida) tem causado preocupação, pois contribui para aumentar a proporção de mortes por tuberculose, estando freqüentemente associada à infecção por HIV. A presença de linhagens multirresistentes reflete deficiências no controle da

tuberculose, o que dificulta o tratamento e a prevenção da doença, causando a sua difusão (ROSSETTI et al.¹³⁶, 2002).

As micobactérias são caracterizadas por um envelope celular altamente hidrofílico que atua como uma barreira de permeabilidade para muitos componentes e que possui um efluxo de fármacos bem desenvolvido. As micobactérias também produzem enzimas hidrolíticas ou fármaco-modificadoras como β -lactamases e aminoglicosídeo acetil transferases, que explicam a resistência natural de muitas espécies de micobactérias aos antibióticos freqüentemente empregados (DAVID³⁷, 1981; COLE et al.²⁶, 1998).

Análises genéticas e moleculares de bacilos resistentes sugerem que a resistência é usualmente adquirida por alterações no alvo do fármaco como consequência de mutações no gene que codifica esse alvo. Durante a exposição de *M. tuberculosis* ao fármaco, existe uma pressão seletiva para mutantes resistentes. As linhagens multirresistentes surgem após uma seqüência de mutações nos diferentes genes envolvidos com cada um dos fármacos (ZHANG et al.¹⁸⁶, 1992).

2.4 Microrganismos superinfectantes na cavidade bucal

A cavidade bucal humana é naturalmente habitada por inúmeros microrganismos. As bactérias possuem características que permitem sua colonização não só nas superfícies dentárias como também no sulco gengival, na mucosa jugal e na língua. Em geral esses microrganismos vivem em harmonia com o hospedeiro, porém em algumas circunstâncias, tem potencial para causar doenças como cárie e doença periodontal (MOORE & MOORE¹⁰⁶, 1994).

Antibioticoterapia prolongada pode causar o desenvolvimento de superinfecções, inclusive na cavidade bucal (SLOTS et al.¹⁵⁴, 1990; HELOVUO et al.⁶³, 1993). Superinfecções são novas infecções que dificultam o tratamento de um processo infeccioso já existente, geralmente ocorrendo devido a uma complicação da terapia antimicrobiana, que altera a microbiota comensal e causa crescimento de microrganismos residentes potencialmente patogênicos ou patógenos oportunistas (VAN WINKELHOFF et al.¹⁷⁰, 1996). Enterobactérias, estafilococos e leveduras são considerados microrganismos superinfectantes e podem ser encontrados na saliva, nas mucosas bucais, no biofilme supragengival e nas bolsas periodontais (RAMS et al.¹³², 1990; SLOTS et al.¹⁵⁴, 1990). Sua ocorrência na cavidade bucal tem sido associada a antibioticoterapia prolongada, resposta imune deficiente e higiene bucal inadequada (HELOVUO et al.⁶³, 1993; SLOTS et al.¹⁵⁶, 1991).

A ocorrência de *Candida* spp. pode ser observada na cavidade bucal, sendo considerados fungos comensais. *C. albicans* é a espécie predominante na microbiota bucal, constituindo 60 a 70% do total de isolamento, seguida por *C. tropicalis* e *C. glabrata* (STENDERUP et al.¹⁶⁵, 1990; JORGE et al.⁷², 1997; GRIMOUD et al.⁵², 2003; RIBEIRO¹³⁵, 2003; ZÖLLNER & JORGE¹⁸⁷, 2003). Entretanto, em determinados indivíduos e em situações específicas, podem transformar-se na forma parasitária (SAMARANAYAKE & MACFARLANE¹³⁹, 1990), produzindo candidoses bucais (HOLMSTRUP & AXÉLL⁶⁶, 1990).

Alterações nas células de defesa do hospedeiro, na fisiologia destas ou na microbiota normal são fatores que usualmente precedem a colonização, infecção e doenças produzidas por leveduras do gênero *Candida*. A severidade da doença depende das alterações apresentadas pelo hospedeiro, assim como das propriedades patogênicas exibidas pelo microrganismo, sendo que o grau de debilidade do hospedeiro deve ser considerável para permitir a invasão desses

microrganismos, considerados saprófitas. As razões pelas quais indivíduos saudáveis são colonizados por *Candida* spp. ainda são desconhecidas. Fatores nutricionais, interação com bactérias da microbiota e presença de anticorpos na saliva parecem influenciar a incidência desses fungos na cavidade bucal (STENDERUP¹⁶⁵, 1990).

Jorge et al.⁷² (1997) analisaram a presença de espécies do gênero *Candida* na saliva de indivíduos normais, comparando-a com indivíduos que apresentavam diferentes fatores predisponentes, entre eles, presença de próteses, aparelhos ortodônticos, indivíduos diagnosticados com periodontite crônica e respiradores bucais. Os resultados demonstraram maior porcentagem de indivíduos positivos para *Candida* nos grupos com fatores predisponentes (73,80%) em relação aos controles (38,42%). Houve predominância de *C. albicans* em ambos os grupos, entretanto foi observada uma maior variedade de espécies isoladas dos indivíduos com fatores predisponentes.

Deficiências nutricionais têm sido relacionadas com o desenvolvimento de infecções por *Candida*. Essa relação foi observada em um estudo onde a prevalência de espécies do gênero *Candida* foi avaliada entre crianças saudáveis e crianças HIV-positivas nos Estados Unidos e um grupo de crianças com deficiências nutricionais na Nigéria. A frequência destes fungos assim como a variedade de espécies usualmente menos isoladas e menos patogênicas foi consideravelmente maior na população nigeriana (JABRA-RIZK et al.⁷⁰, 2001).

Nas últimas décadas, a associação entre valores de UFC/mL de *Candida* e algumas patologias da cavidade bucal tem sido investigada. Considerando-se que o agente etiológico *Candida* é usualmente encontrado na maioria das formas de candidoses e em algumas condições menos comuns, deve-se ressaltar a prevalência de *C. albicans* e todas as espécies deste gênero, como microrganismos que, em pequeno número, compõem o trato digestivo e regiões mucocutâneas normais e alteradas do ser humano. Alterações na microbiota bucal

ocorrem em indivíduos xerostômicos. A xerostomia decorrente do tratamento com radioterapia pode interferir no equilíbrio ecológico da microbiota bucal, favorecendo o aparecimento de infecções e maior proliferação de microrganismos. Indivíduos portadores de carcinoma espinocelular na região de orofaringe submetidos a tratamento radioterápico, apresentaram aumento de *Candida* spp., o qual pode persistir por vários meses, propiciando maior susceptibilidade à candidose (SPOLIDORIO et al.¹⁶⁴, 2001).

A infecção por *Candida* é a manifestação bucal mais comum em infecção por HIV e é reconhecida como importante marcador da doença e sua progressão. A candidose bucal desenvolve-se em 90 a 95% dos indivíduos HIV-positivos sintomáticos e a prevalência está relacionada com a severidade da disfunção imunológica. A candidose bucal pode ocorrer em estágios precoces da doença quando as células CD₄ podem estar baixas (400 a 700 cel/mm³) e a freqüência da candidose bucal aumenta quando essa taxa apresenta-se inferior a 300 cel/mm³ (GREENSPAN⁵¹, 1994). Figueiredo et al.⁴² (2001) relataram a ocorrência de *Candida* spp. em 70,97% dos indivíduos HIV-positivos analisados, nos quais a média de células CD₄ foi de 291,61 cel/mm³. *C. albicans* foi a espécie mais encontrada, representando 69,9% dos isolados.

Considerando-se que a presença de fungos na saliva não está, necessariamente, baseada em fatores patológicos, e que esta incidência na cavidade bucal é relacionada com balanço homeostático, Moreira et al.¹⁰⁸ (2001) avaliaram a freqüência de *Candida* spp. na cavidade bucal de crianças saudáveis entre seis e oito anos de idade de diferentes categorias econômicas em Piracicaba, São Paulo, e a relação com parâmetros salivares. Os resultados demonstraram a presença de *Candida* spp. em 47,3% das amostras, sendo *C. albicans* a espécie mais comumente isolada em todas as categorias sócio-econômicas, seguida por *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Neste estudo não foi

observada correlação entre velocidade do fluxo salivar, capacidade tampão da saliva e *Candida* spp.

Darwazeh et al.³⁶ (2002) relataram associação entre as condições de higiene bucal e a colonização da cavidade bucal por leveduras do gênero *Candida*. A prevalência de *Candida* spp. foi mais elevada nos indivíduos que não apresentaram hábitos regulares de higiene bucal quando comparados aos que apresentaram (72% e 45,5%, respectivamente).

A presença de leveduras do gênero *Candida* em indivíduos receptores de transplante cardíaco ortotópico que não apresentavam evidência clínica de candidose bucal e indivíduos controle foi avaliada por Ribeiro¹³⁵ (2003). Observou-se uma maior proporção destes microrganismos na cavidade bucal dos transplantados cardíacos analisados (88%) quando comparado ao grupo controle (56%). Neste estudo, *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente em ambos os grupos, sendo isoladas também cepas de *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. stellatoidea*.

Fatores de risco para colonização da cavidade bucal por espécies de *Candida* foram avaliados em indivíduos que permaneceram em instituições geriátricas por períodos prolongados por Grimoud et al.⁵² (2003). Verificou-se a presença de *Candida* spp. em 67,3% dos indivíduos avaliados, sendo que 42,7% destes apresentaram candidose relacionada com o uso de próteses totais em 55,6% dos casos. *C. albicans* foi a espécie mais freqüentemente isolada (73%) seguida por *C. glabrata* (24%). Dentre os fatores de risco avaliados observou-se uma relação entre o uso de próteses totais e a colonização da cavidade bucal por *Candida* spp., e entre o número de *Candida* spp. e o desenvolvimento de candidose. Por outro lado, quatro fatores avaliados não apresentaram relação com o desenvolvimento de candidose entre eles: uso de próteses totais, dependência física do indivíduo, condições de higiene bucal e xerostomia.

Zöllner & Jorge¹⁸⁷ (2003) avaliaram a presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de lactentes em aleitamento materno predominante e de suas mães, assim como na cavidade bucal de lactentes em aleitamento artificial e em mulheres na ausência de lactação. Espécies de *Candida* foram detectadas a partir de um número significativamente menor de crianças em aleitamento natural predominante (34,5%) que de crianças em aleitamento artificial (66,7%). *C. albicans* foi a espécie mais prevalente tanto em crianças em aleitamento natural como em aleitamento artificial (57,9% e 46,1%, respectivamente), seguida por *C. parapsilosis* (26,3% e 23,1%) e *C. tropicalis* (10,5% e 19,2%).

A prevalência de *Candida* spp. na cavidade bucal de crianças tratadas com corticosteróides inalados foi avaliada no estudo de Komiyama et al.⁸³ (2004). Foram encontradas leveduras do gênero *Candida* em 43,33% dos indivíduos usuários de corticosteróides e em 30% dos indivíduos do grupo controle. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente em ambos os grupos, seguida por *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. stellatoidea*. Neste estudo não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na presença e na quantidade de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de crianças tratadas com corticosteróides inalados.

Monroy et al.¹⁰⁵ (2005) avaliaram a presença de *C. albicans* e *Staphylococcus aureus* na cavidade bucal de 105 indivíduos portadores de próteses dentais na presença ou ausência de estomatite protética e a relação com fatores sistêmicos. A colonização bucal por *C. albicans* e por *S. aureus* foi observada em 51,4% e em 52,4% dos indivíduos analisados, respectivamente. Observou-se ainda uma associação entre presença de *C. albicans* e *S. aureus* em 39 dos cinquenta indivíduos com estomatite protética. Entretanto a elevada prevalência de diabetes *mellitus* (21,9%) e hipertensão arterial (17,1%)

não demonstraram correlação estatística com a colonização bucal por *C. albicans* e *S. aureus*.

Fatores predisponentes para a colonização bucal por leveduras do gênero *Candida* em 128 indivíduos com diabetes *mellitus* tipo II e em 84 indivíduos sistemicamente saudáveis foram avaliados por Belazi et al.¹⁰ (2005). *Candida* spp. foi isolada da cavidade bucal de 64% dos indivíduos com diabetes *mellitus*, em contraste com 40% dos indivíduos do grupo controle, sendo que *C. albicans* foi a espécie mais prevalente em ambos os grupos. Os autores relataram que a colonização por *Candida* spp. foi significativamente maior nos indivíduos com diabetes *mellitus* quando comparada aos indivíduos controle. Entretanto outros fatores como xerostomia, próteses, idade, gênero e controle glicêmico não foram diretamente associados com a colonização por *Candida* spp. na cavidade bucal na presença de diabetes.

Microrganismos como pseudomonas, bacilos entéricos e estafilococos não são usualmente encontrados na cavidade bucal. Quando presentes encontram-se em números reduzidos e são considerados como parte da microbiota transitória. Entretanto, a administração sistêmica prolongada de antimicrobianos ou imunossupressão podem promover um aumento desses microrganismos (SLOTS et al.¹⁵⁵, 1988; DAHLÉN & WIKSTRÖM³², 1995). Essas infecções são referidas como infecções oportunistas (KLASTERSKY⁸⁰, 1985).

As bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae são exaustivamente estudadas pela área médica, sendo conhecida sua patogenicidade no organismo humano, porém, na cavidade bucal, estas bactérias não eram consideradas patogênicas. Entretanto, a presença destas bactérias na cavidade bucal pode servir como reservatório, podendo comprometer gravemente a vida de indivíduos debilitados (PETERSON et al.¹²⁶, 1990; SLOTS et al.¹⁵³, 1990; SLOTS et al.¹⁵⁶, 1991). Embora os microrganismos das famílias Enterobacteriaceae e do gênero *Pseudomonas* não pertençam a

microbiota bucal residente, Santos & Jorge¹⁴⁵ (1998) em amostragem aleatória e heterogênea, encontraram elevada prevalência (51%) destes microrganismos na cavidade bucal de indivíduos da região do Vale do Paraíba.

Pannuti et al.¹²¹ (2001) avaliaram a prevalência de enterobactérias, estafilococos e leveduras do gênero *Candida* no biofilme supragengival de indivíduos portadores de paralisia cerebral institucionalizados. Enterobactérias foram encontradas em 33,3% dos indivíduos, sendo a espécie mais freqüentemente isolada *Serratia marcescens*, seguida de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* e *Serratia liquefacens*. Estafilococos e leveduras foram isolados de 13,3% e 26% dos indivíduos, respectivamente. Os autores sugeriram que a presença desses microrganismos foi transitória, não representando superinfecção.

Santos et al.¹⁴⁶ (2002) relataram a prevalência de Enterobacteriaceae e bactérias do gênero *Pseudomonas* na cavidade bucal de 43,18% de indivíduos diagnosticados com periodontite crônica, sendo a espécie *Enterobacter cloacae* a mais prevalente. Neste estudo não houve correlação entre a presença destes microrganismos e faixa etária, hábito de fumar e doenças sistêmicas.

Martins et al.⁹⁷ (2002) estudaram a prevalência de *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp. coagulase positiva na cavidade bucal de 68 indivíduos. *Candida* spp. foi isolada de 61,76% dos indivíduos examinados, sendo *C. albicans* a espécie mais freqüentemente isolada. Foi observada a presença de *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal de 95,60% dos indivíduos, sendo 63% das amostras coagulase negativas. Entre as amostras coagulase positivas *S. hyicus* foi a espécie mais prevalente (17,0%), seguida de *S. aureus* (13,9%) e *S. schleiferi* (6,1%). Não foi observada correlação entre as contagens de *Candida* spp. e *Staphylococcus* spp. nos indivíduos deste estudo.

A presença de *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal e bolsa periodontal de indivíduos diagnosticados com periodontite crônica foi avaliada por Loberto et al.⁹³ (2004). A prevalência destes microrganismos foi de 61,36% na cavidade bucal e 37,5% em bolsa periodontal dos indivíduos estudados, sendo que 27,27% apresentaram o microrganismo em ambos os sítios. *S. epidermidis* foi a espécie mais prevalente tanto na cavidade bucal como na bolsa periodontal. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com relação à presença do microrganismo entre as faixas etárias, hábito de fumar e aumento da profundidade de sondagem.

2.5 Microrganismos superinfectantes e doença periodontal

O desenvolvimento da doença periodontal envolve destruição dos tecidos de suporte dos dentes. Essa destruição pode ocorrer por ação direta dos produtos bacterianos ou por ação indireta, em que reações destrutivas são mediadas por células do hospedeiro, induzidas por bactérias presentes no ambiente subgingival (AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY⁶, 1999).

Entre as diversas espécies que habitam a cavidade bucal, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Veillonella parvula*, *Treponema denticola*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus* são consideradas verdadeiros patógenos periodontais por estarem envolvidas diretamente com o início e progressão da doença periodontal (HAFFAJEE & SOCRANSKY⁵⁵, 1994; DARVEAU et al.³⁵, 1997; SOCRANSKY & HAFFAJEE¹⁶⁰, 2002).

Além da diversidade de espécies bacterianas, a severidade a doença periodontal varia amplamente entre os indivíduos afetados em decorrência da resposta inflamatória e imunológica que se estabelece em resposta a antígenos periodontopatogênicos, que pode levar a alterações patológicas nos tecidos do hospedeiro. Assim sendo, a doença periodontal tem sido descrita como uma doença de natureza multifatorial, resultado de uma interação complexa entre microrganismos patogênicos e defesa do hospedeiro, cujo desenvolvimento pode ser modificado por fatores locais como, por exemplo, fumo, doenças sistêmicas ou fatores genéticos (KINANE & LAPPIN⁷⁸, 2001). Além disso, supercrescimento de espécies oportunistas em relação aos periodontopatógenos também foram relacionados com a severidade da doença periodontal (SOCRANSKY & HAFFAJEE¹⁵⁹, 1992).

Tem crescido o interesse em espécies bacterianas não comumente encontradas no biofilme subgengival, como indicadores ou contribuintes potenciais para a patogênese da doença periodontal (HAFFAJEE & SOCRANSKY⁵⁵, 1994). Bacilos entéricos, pseudomonas, estafilococos, estreptococos beta-hemolíticos e leveduras tem sido descritos como microrganismos superinfectantes em periodontites (SLOTS et al.¹⁵⁵, 1988; RAMS et al.¹³³, 1990; RAMS & SLOTS¹³¹, 1991; FLYNN & SLOTS⁴⁴, 1993; VAN WINKELHOFF et al.¹⁷⁰, 1996; PANNUTI et al.¹²¹, 2001; ADDY & MARTIN¹, 2003).

Superinfecções podem envolver microrganismos endógenos ou exógenos. Estes microrganismos comumente ocorrem em combinação com os patógenos periodontais. Ainda não está esclarecido se estes microrganismos estão envolvidos no início do desenvolvimento ou na progressão da doença periodontal. Baseado no potencial patogênico dos microrganismos superinfectantes em infecções sistêmicas parece plausível a possibilidade destes em contribuir para a progressão da doença periodontal (VAN WINKELHOFF et al.¹⁷⁰, 1996).

Enterobactérias e pseudomonas apresentam potencial patogênico significativo que, associado à proporção elevada destes microrganismos na área subgengival, podem implicar em fracasso da terapia periodontal e recidiva da doença. A terapia periodontal mecânica por si só não consegue eliminar bacilos entéricos e pseudomonas de lesões periodontais avançadas, sendo necessária a associação de agentes antimicrobianos para o tratamento das infecções periodontais envolvendo estes microrganismos (SLOTS et al.¹⁵³⁻⁴, 1990).

A ocorrência de bacilos entéricos, leveduras e estafilococos foi avaliada em indivíduos com periodontite crônica por Rams et al.¹³² (1990). Os indivíduos foram tratados com terapia periodontal mecânica associada a doxiciclina sistêmica, sendo administradas 200 mg no primeiro dia e 100 mg/dia por um período de vinte dias. Inicialmente números reduzidos desses microrganismos foram detectados subgengivalmente. Entretanto, após a terapia antibiótica ocorreu aumento significativo de *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Staphylococcus* spp. Dessa forma, observou-se que a terapia com doxiciclina sistêmica pode resultar em, pelo menos, supercrescimento temporário de bacilos entéricos, leveduras e estafilococos, indicando o risco do uso freqüente de tetraciclina no tratamento periodontal.

Helovuo et al.⁶³ (1993) relataram que a administração sistêmica de penicilina e eritromicina para tratamento de infecções do trato respiratório em indivíduos com doença periodontal pré-existente resultou em superinfecção por bacilos entéricos, estafilococos coagulase-positivos e leveduras. Nesse estudo a superinfecção foi caracterizada pela ocorrência de abscessos periodontais agudos em 42% dos indivíduos submetidos a tratamento com penicilina sistêmica na ausência de terapia periodontal.

A presença de enterobactérias, pseudomonas, estafilococos e leveduras foi detectada mais freqüentemente e em

proporções mais elevadas em sítios periodontais de indivíduos fumantes do que em não-fumantes. Conseqüentemente, acredita-se que o fumo, por causar modificações locais e sistêmicas na resistência do hospedeiro e alterações no nicho ecológico, favorece a proliferação de microrganismos anaeróbios e oportunistas, predispondo à progressão da doença periodontal (KAMMA et al.⁷³, 1999).

Barbosa et al.⁸ (2001) avaliaram a ocorrência subgengival de bacilos entéricos e pseudomonas em indivíduos com doença periodontal, sendo isoladas trinta cepas desses microrganismos em 31,2% dos indivíduos analisados. As espécies mais freqüentemente isoladas foram *P. aeruginosa* e *S. marcescens*. Os autores sugeriram que a eliminação desses patógenos oportunistas pode ser importante para a resolução dos processos infecciosos periodontais. Além disso, a elevada porcentagem de indivíduos colonizados por estes microrganismos, resistentes aos agentes antimicrobianos mais comumente empregados como amoxicilina/ácido clavulânico e doxiciclina, indica a necessidade da detecção microbiológica dessas cepas e da realização de testes de susceptibilidade previamente a terapia antibiótica.

Hannula et al.⁵⁷ (2001) estudaram a possível relação entre a presença subgengival de *C. albicans* e coexistência de periodontopatógenos. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foi detectado em proporções significativamente elevadas em indivíduos positivos para *C. albicans*, enquanto *P. gingivalis* foi isolado menos freqüentemente, quando comparado com indivíduos negativos para *C. albicans*. Entretanto, os autores não excluíram a possibilidade de outros microrganismos serem importantes determinantes da colonização e persistência subgengival de *C. albicans*.

Martins et al.⁹⁸ (2002) correlacionaram a ocorrência de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal e em bolsas periodontais. Observou-se que 31,82% dos indivíduos com periodontite crônica avaliados apresentaram estes microrganismos na cavidade bucal

e 7,96% em bolsas periodontais, sendo que 6,82% apresentaram leveduras tanto na cavidade bucal quanto na bolsa periodontal. *C. albicans* foi a espécie mais freqüentemente encontrada, compreendendo 83,34% e 85,72% dos isolados a partir de enxágüe bucal e bolsa periodontal, respectivamente.

Staphylococcus tem sido recuperados de abscessos periodontais agudos em indivíduos imunocomprometidos e de infecções periodontais após terapia com antibiótico sistêmico. Um significativo aumento subgingival de *S. aureus* foi observado em indivíduos com periodontite submetidos à terapia com penicilina sistêmica, incluindo cepas resistentes ao antibiótico (HELOVUO et al.⁶³, 1993).

Estafilococos têm sido isolados tanto de sítios subgingivais de indivíduos diagnosticados com periodontite quanto de sítios periodontalmente saudáveis, o que não permite esclarecer a existência de uma relação causal entre estes microrganismos e doença periodontal crônica. Murdoch et al.¹¹¹ (2004) relataram a presença de estafilococos em 54% de sítios subgingivais com doença periodontal e em 43% de sítios subgingivais periodontalmente saudáveis de indivíduos com doença periodontal, e em 29% de sítios sem doença periodontal de indivíduos controle. Os autores consideraram que a ocorrência subgingival destes microrganismos pode atuar como um reservatório para infecções sistêmicas em sítios com atividade de doença periodontal.

Um importante mecanismo de resistência bacteriana frente às penicilinas é a produção de β -lactamases. Dessa forma, a produção desta enzima por microrganismos na área subgingival resultam em falência da terapia com antibióticos β -lactâmicos comumente utilizados e recorrência da doença. *Staphylococcus* spp. produtores de β -lactamases foram detectados em indivíduos que apresentavam sítios com doença periodontal refratária (HANDAL et al.⁵⁶, 2004).

Existem evidências de que o uso prolongado de antibióticos e fatores relacionados ao hospedeiro, como imunossupressão, podem

estar relacionados com alterações da microbiota bucal normal e possível aumento na ocorrência de microrganismos oportunistas. Neste contexto, justifica-se a elaboração do presente estudo para avaliar se a terapia antibiótica prolongada utilizada no tratamento da tuberculose pode favorecer a colonização da cavidade bucal e da área subgengival desses indivíduos por *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas*, bacilos entéricos e leveduras do gênero *Candida*.

2.6 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* pertence à classe *Deuteromycetes*, família *Cryptococcaceae*, que inclui as principais leveduras patogênicas para o homem, sub-família *Candidoideae*. São classificadas como fungos imperfeitos por não apresentarem ciclo sexual (SAMARANAYAKE & MACFARLANE¹³⁹, 1990; WEBB et al.¹⁷⁵, 1998; KOGA-ITO et al.⁸², 2006).

Dentro deste gênero as espécies são caracterizadas primariamente pela morfologia das colônias, utilização de carbono e fermentação. As principais espécies de *Candida* consideradas importantes patógenos humanos são: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilliermondi*, *C. krusei* e *C. kefyr* (CANNON et al.¹⁹, 1995). Em 1997 foi descrita uma nova espécie capaz de causar infecção em humanos, até então não diferenciada de *C. albicans*, isolada da cavidade bucal de indivíduos portadores de HIV, que recebeu a denominação de *C. dubliniensis* (GILFILLAN et al.⁴⁸, 1998).

As leveduras do gênero *Candida* são organismos eucarióticos, unicelulares que se multiplicam por brotamento, produzem hifas septadas e pseudohifas. Hifas verdadeiras são produzidas por algumas espécies de *Candida*, como *C. tropicalis*, em certas

circunstâncias, entretanto são principalmente associadas com *C. albicans* (WEBB et al.¹⁷⁵, 1998).

Em meio sólido com pH entre 2,5 e 7,5, temperatura entre 20 e 38°C e em condições de aerobiose, as colônias de leveduras do gênero *Candida* variam quanto a cor, sendo geralmente brancas a creme ou ligeiramente acinzentadas ou róseas. A textura pode ser cremosa ou membranosa, com superfícies lisas, rugosas ou sulcadas, brilhante ou opaca. De modo geral as formas das colônias são circulares e as bordas ou margens, regulares ou irregulares. O crescimento é usualmente detectado ente 48 a 72 horas. A habilidade de crescimento a 37°C é uma característica importante a ser considerada na identificação a partir de amostras clínicas, sendo que, as espécies mais patogênicas, têm seu crescimento entre 25°C a 37°C, enquanto que espécies saprófitas geralmente apresentam crescimento enfraquecido em temperaturas mais elevadas (WEBB et al.¹⁷⁵, 1998).

Sabe-se que a ocorrência de *Candida* spp. pode ser observada na microbiota normal humana. *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* entre outras espécies, podem ser isoladas das superfícies mucosas sadias da cavidade bucal, vagina, trato gastrointestinal e região retal. Até 80% dos indivíduos podem exibir colonização desses locais na ausência de doença. Quando estes fungos tornam-se patogênicos, ao se aproveitarem da condição debilitada do hospedeiro, são usualmente denominados fungos oportunistas. Nestas circunstâncias podem produzir invasão da corrente sanguínea, tromboflebite, endocardite, infecções oculares e de praticamente qualquer órgão ou tecido quando introduzida por via intravenosa (CAPOOR et al.²¹, 2005; LAUPLAND et al.⁹⁰, 2005; BASSETTI et al.⁹, 2006).

Relata-se que, em geral, cada indivíduo é portador de apenas uma única espécie de *Candida* em diferentes partes do organismo por períodos prolongados. Entretanto, alguns indivíduos podem apresentar mais de uma espécie ou cepa simultaneamente, sendo esse

fato mais comum em indivíduos hospitalizados ou imunocomprometidos (McCULLOUGH et al.¹⁰¹, 1996).

A incidência de *Candida* spp. na cavidade bucal e as razões para o estabelecimento de infecções causadas por esses microrganismos podem estar relacionadas com imunossupressão, desordens endócrinas, lesões em mucosas, higiene bucal deficiente e tratamento prolongado com antibióticos e corticosteróides (RAMIREZ-AMADOR et al.¹³⁰, 1997). Alterações no fluxo e pH da saliva, no sistema imune e na microbiota normal, são fatores que usualmente precedem a colonização, infecção e doenças produzidas por leveduras (WEBB et al.¹⁷⁵, 1988).

C. albicans é considerada a espécie do gênero *Candida* mais freqüentemente isolada (Quadro 4) (CANNON et al.¹⁹, 1995; McCULLOUGH, et al.¹⁰¹, 1996; JORGE et al.⁷², 1997; FIGUEIREDO et al.⁴² 2001; GRIMOUD et al.⁵², 2003; ZÖLLNER & JORGE¹⁸⁷, 2003). Al-Abeid et al.⁴ (2004) avaliaram a presença de *Candida* spp. na cavidade bucal de indivíduos portadores de câncer e indivíduos saudáveis. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente entre os isolados tanto de indivíduos com câncer (31,5%) quanto saudáveis (27,7%), seguida por *C. glabrata* (23,2% e 6,2%, respectivamente). Foram isolados ainda *C. parapsilosis* (12,6%) e *C. tropicalis* (5,3%) dos indivíduos com câncer. A incidência relatada de *C. dubliniensis* em indivíduos HIV positivos, indivíduos com AIDS e indivíduos HIV negativos tem sido entre 2,7% e 5,4% (YANG et al.¹⁸³, 2003; CHAVASCO et al.²⁵, 2006).

Quadro 4 – Frequência de espécies de *Candida* isoladas da cavidade bucal^{4, 19, 25, 42, 52, 72, 182, 187}

Espécie	Frequência (%)
<i>Candida albicans</i>	47-75
<i>Candida tropicalis</i>	1-7
<i>Candida glabrata</i>	7-24
<i>Candida krusei</i>	< 5
<i>Candida parapsilosis</i>	5-7
<i>Candida guilliermondi</i>	< 5
<i>Candida dubliniensis</i>	2,7-5,4

C. dubliniensis compartilha de muitas características fenotípicas com *C. albicans*, como capacidade de produzir tubo germinativo e clamidoconídeos, capacidade de crescimento a 30°C e 37°C em meio de cultura ágar Sabouraud (COLEMAN et al.²⁷, 1997; SULLIVAN et al.¹⁶⁶, 2005). Por serem similares fenotipicamente acredita-se que *C. dubliniensis* tenha sido identificada como *C. albicans* ou *C. stellatoidea* por um longo período de tempo (SULLIVAN et al.¹⁶⁶, 2005).

Alguns autores acreditam que *C. dubliniensis* possa ser um microrganismo comensal da cavidade bucal (COLEMAN et al.²⁷, 1997; AHMAD et al.³, 2004). Entretanto tem sido frequentemente associada como patógeno emergente em indivíduos imunocomprometidos e HIV positivos (AHMAD et al.³, 2004; CHAVASCO et al.²⁵, 2006).

C. albicans é isolada do organismo humano tanto como microrganismo comensal quanto patógeno oportunista. É um fungo dimórfico, podendo apresentar-se na forma de levedura ou hifa. A transição entre células leveduriformes e forma filamentosa requer algumas condições, como estágio nutritivo apropriado, presença de fatores indutores, temperatura superior a 33°C e pH próximo a neutro (SAMARANAYAKE & MACFARLANE¹³⁹, 1990).

Existem dois sorotipos de *C. albicans* (sorotipos A e B) revelados inicialmente através de provas de soro-aglutinação por Hasenclever & Mitchell⁵⁸ (1961). Estudos realizados com indivíduos portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida confirmaram a predominância do sorotipo A em 70% (CAPOLUONGO et al.²⁰, 2000) e 78% (SANT'ANA et al.¹⁴², 2002) dos isolados. Sant'ana et al.¹⁴² (2002) relataram ainda a ocorrência de co-infecção com ambos os sorotipos de *C. albicans* em 9% dos indivíduos avaliados.

Os fatores de virulência expressos ou requeridos por *C. albicans* para causar infecções são bastante variáveis e dependentes do tipo, estágio e sítio de infecção, e também da natureza da resposta do hospedeiro. *C. albicans* apresenta alta capacidade de adaptação no organismo hospedeiro, o que indica a presença de fatores de virulência distintos de outros fungos não-patogênicos fortemente relacionados, como *Saccharomyces cerevisiae*. Vários fatores potencialmente virulentos tem sido descritos incluindo a morfologia celular, habilidade de formar tubos germinativos e hifas, aderência às células do hospedeiro e secreção de proteinases (HUBE & NAGLIAK⁶⁹, 2001; YANG¹⁸², 2003).

A parede celular de *C. albicans* é composta primariamente de manana, glucana, manoproteínas, quitina e proteínas. A manana de *Candida* é um potente imunógeno e quase todos os soros humanos contém IgG contra ela. Além disso, glucana, quitina, proteínas e lipídeos da parede celular podem atuar como adesinas (OLSEN¹¹⁹, 1990; McCULLOUGH et al.¹⁰¹, 1996; MASUOKA & HAZEN⁹⁹, 2004).

A colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro por *Candida* spp. dependem da habilidade do microrganismo de aderir-se às superfícies mucosas (OLSEN¹¹⁹, 1990). *C. albicans* apresenta capacidade de aderência a células epiteliais, células endoteliais e células fagocíticas e também a materiais não-biológicos *in vivo* e *in vitro* (SEGAL et al.¹⁵⁰, 1988; SAMARANAYAKE & MACFARLANE¹³⁹, 1990; BENDEL & HOSTETTER¹¹, 1993; RAMAGE et al.¹²⁹, 2001; VIDOTTO et al.¹⁷², 2003).

C. albicans expressam adesinas que reconhecem proteínas na matriz extracelular das células do hospedeiro, incluindo laminina, colágeno, fibrinogênio e fibronectina. *C. albicans* produz um polímero extracelular que contém a adesina manoproteína. A interação entre o microrganismo e as células epiteliais ocorre através da porção protéica da manoproteína e a fucose ou N-acetilglicosamina, encontradas nas glicoproteínas das células epiteliais (WEBB et al.¹⁷⁵, 1998; DALLE et al.³³, 2003; MASUOKA & HAZEN⁹⁹, 2004).

Tem sido demonstrada forte correlação entre formação de tubo germinativo e o aumento na aderência de *C. albicans* a células epiteliais bucais, sendo que a forma hifal apresenta-se relacionada com a invasividade do microrganismo. Considera-se que as proteinases produzidas durante a formação de hifas auxiliam na ruptura da integridade da mucosa bucal (KIMURA & PEARSALL⁷⁷, 1978; KRETSCHMAR et al.⁸⁷, 1999; DALLE et al.³³, 2003; DAGDEVISEN et al.³¹, 2005).

Além disso, a hidrofobicidade da superfície celular de *Candida* spp. está envolvida na aderência das leveduras às células epiteliais humanas e materiais plásticos. Células hidrofóbicas demonstraram aderir difusa e copiosamente aos tecidos do hospedeiro, enquanto que, a aderência de células hidrofílicas é restrita a sítios específicos. Alterações protéicas na parede celular parecem ser responsáveis pela hidrofobicidade e hidrofilicidade. As células hidrofílicas aderem a regiões com presença de macrófagos em contraste com as células hidrofóbicas que se aderem a áreas do tecido livres de macrófagos. Isto demonstra que as células hidrofílicas são mais facilmente removidas por fagocitose do que as hidrofóbicas, que colonizam as superfícies endoteliais (HAZEN⁵⁹, 1989; HAZEN et al.⁶⁰⁻¹, 1990 e 1991; MASUOKA & HAZEN⁹⁹, 2004).

C. albicans e *C. tropicalis* apresentam maior capacidade de aderência às células do hospedeiro do que espécies relativamente não-patogênicas, como *C. krusei* e *C. guilliermondii*, demonstrando uma

correlação entre aderência e virulência (KIMURA & PEARSALL⁷⁷, 1978). A capacidade de aderência de *C. albicans* também foi superior à apresentada por *C. dubliniensis* (VIDOTTO et al.¹⁷², 2003).

C. albicans secreta várias enzimas que contribuem para sua patogenicidade, incluindo fosfolipases, lipases, fosfomonoestearases, e proteinases aspartil secretórias. Dentre essas enzimas as proteinases são as mais estudadas. A atividade de proteinase é produzida principalmente pelas espécies mais patogênicas que são, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* e demonstram ampla especificidade ao substrato. As proteinases são capazes de degradar IgA secretora, possuem atividade queratinolítica ou colagenolítica. Dessa forma, essas enzimas podem apresentar duas funções na virulência do microrganismo. Primeiramente, a atividade proteolítica pode estar relacionada com a invasão tecidual, e secundariamente, a produção de enzimas pode estar associada com a habilidade do microrganismo de colonizar os tecidos do hospedeiro (KRETSCHMAR et al.⁸⁷, 1999; HUBE & NAGLIAK⁶⁹, 2001; SCHALLER et al.¹⁴⁷, 2005; KUMAR et al.⁸⁸, 2006).

2.7 Gênero *Staphylococcus*

O nome *Staphylococci* foi dado pelo cirurgião Alexander Ogston, em 1880, que correlacionou a alta taxa de mortalidade em decorrência de septicemia após cirurgias hospitalares com a presença destes microrganismos. Após o desenvolvimento da técnica de cirurgias anti-sépticas por Joseph Lister desapareceram as feridas com supuração e as infecções hospitalares. Dessa forma Alexander Ogston correlacionou a formação de pus com a presença de determinados microrganismos que foram denominados de micrococci. Pesquisas subseqüentes permitiram descobrir que alguns destes microrganismos se organizavam em forma de

cachos e os denominou de estafilococos. Posteriormente a espécie *Staphylococcus aureus* foi descoberta por Rosembach (LYELL⁹², 1989).

O gênero *Staphylococcus* compreende 33 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas (Quadro 5) (MARSOU et al.⁹⁶ 1999; KANDA, et al.⁷⁴, 2001; KONEMAN et al.⁸⁵, 2001). O nome *Staphylococcus* é derivado do grego *staphylé* que significa cachos de uva quando visualizados ao microscópio de luz. Apresentam-se como cocos Gram-positivos de 0,5 a 1 μm de diâmetro, imóveis, que podem se agrupar em massas irregulares e também em tétrades e aos pares. São aeróbios ou anaeróbios facultativos e catalase positivos (RAMS et al.¹³³, 1990; KOMURO et al.⁸⁴, 2001; YARWOOD & SCHLIEVERT¹⁸⁴, 2003).

Quadro 5 – Espécies de *Staphylococcus* de origem humana, animal e ambiental, correlacionados com habitat e patogenicidade⁸⁵ (Continua).

Espécie	Habitat	Patogenicidade
<i>S. aureus</i>	Pele, fossas nasais, axilas e vagina	Infecções oportunistas, abscessos, pneumonia, bacteremia, endocardite, meningite
<i>S. epidermidis</i>	Pele, fossa nasal	Endocardite, infecções em cateteres, peritonite, bacteremia, osteomielite, infecções de vias urinárias, mediastinite
<i>S. saprophyticus</i>	Pele	Infecções urinárias agudas, cistite
<i>S. haemolyticus</i>	Pele	Infecções em cateteres, infecções urinárias, endocardites
<i>S. warneri</i>	Pele	Bacteremia relacionada com cateteres, endocardite, osteomielite, meningite
<i>S. hominis</i>	Pele	Bacteremia em pacientes com câncer
<i>S. simulans</i>	Pele, uretra	Septicemia, osteomielite, artrite séptica, endocardite
<i>S. lugdunensis</i>	Pele	Endocardite, celulite, peritonite, osteomielite, abscessos
<i>S. capitis</i>	Glândulas sebáceas do couro cabeludo e fronte	Endocardite
<i>S. schleiferi</i>	Pele	Empiema cerebral, bacteremia, infecções de feridas e de cateteres
<i>S. pasteurii</i>	Alimentos	Não associada a infecções
<i>S. auricularis</i>	Conduto auditivo externo	Raramente associada a infecções
<i>S. cohnii</i>	Pele	Rara
<i>S. xylosum</i>	Pele	Infecções das vias urinárias, endocardite
<i>S. saccharolyticus</i>	Mucosas humanas	Endocardite (raro)
<i>S. caprae</i>	Caprinos, pele humana	Endocardite, infecções intravenosas e urinárias
<i>S. pulvereri</i>	Pele	Infecções pélvicas
<i>S. intermedius</i>	Pele (cães, gatos e cavalos)	Infecções cutâneas, urinárias, ósseas e do sistema nervoso central, feridas infectadas humanas por mordedura de cães
<i>S. hyicus</i>	Suínos, bovinos e leite de vaca	Epidermite exsudativa
<i>S. chromogenes</i>	Bovinos	Infecções cutâneas
<i>S. sciuri</i>	Roedores e outros mamíferos	Feridas, endocardite

Quadro 5 – Espécies de *Staphylococcus* de origem humana, animal e ambiental, correlacionados com habitat e patogenicidade⁸⁵ (Conclusão).

Espécie	Habitat	Patogenicidade
<i>S. gallinarum</i>	Aves domésticas	Não patogênica
<i>S. lentus</i>	Ovinos e caprinos	Tonsilites
<i>S. equorum</i>	Eqüinos	Não patogênica
<i>S. delphini</i>	Golfinhos	Lesões cutâneas purulentas
<i>S. felis</i>	Gatos	Otite, cistite, abscessos, feridas e outras infecções cutâneas
<i>S. muscae</i>	Insetos que habitam pele de bovinos	Rara
<i>S. piscifermentans</i>	Peixes e farelo de soja	Rara
<i>S. vitulus</i>	Cavalos, ratos-calunga e baleias piloto	Rara
<i>S. carnosus</i>	Meio ambiente	Não patogênico. Utilizado como indicador no processamento de produtos a base de carnes, como salame e salsichas.
<i>S. caseolyticus</i>	Bovinos, baleias, leite e outros produtos lácteos	Não patogênica
<i>S. kloosii</i>	Mamíferos	Não patogênica
<i>S. arlettae</i>	Mamíferos e aves	Não patogênica

As colônias de estafilococos em meio sólido geralmente são lisas, brilhantes, circulares e translúcidas. *S. aureus* e algumas outras espécies formam colônias amarelas, acinzentadas ou laranja, em função da presença de grande quantidade de pigmentos carotenóides localizados na membrana celular. Em placas de ágar-sangue *S. aureus* geralmente produz hemólise, enquanto que outras espécies têm comportamento variável. Esses microrganismos crescem dentro de larga faixa de temperatura (10-45°C), com temperatura ótima de crescimento em torno de 37°C. Os estafilococos estão entre as mais resistentes de todas as bactérias não formadoras de esporos. Permanecem vivos durante meses

em placas de ágar seladas mantidas a 4°C e podem ser cultivados de amostras de pus dessecadas há várias semanas. A maioria das amostras é relativamente termoestável, suportando temperaturas de até 60°C durante meia hora. São mais resistentes que a maioria das bactérias a desinfetantes como cloreto de mercúrio e fenol. Crescem em meios de cultura em variada gama de pH (4,8 a 9,4) (UENO & JORGE¹⁶⁹, 2006).

Os estafilococos são geralmente encontrados na pele e em mucosas do homem e outros animais. Pertencem a microbiota humana normal da pele, conjuntiva, naso e orofaringe, trato gastrointestinal e geniturinário (RAMS et al.¹³², 1990). Alguns estafilococos patogênicos para o homem e animais produzem coagulase, e a detecção desta enzima é realizada em laboratório para identificação desses microrganismos. Entre os estafilococos, a espécie coagulase-positiva *S. aureus* e duas espécies coagulase-negativas, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, são encontradas com freqüência em infecções humanas (YARWOOD & SCHLIEVERT¹⁸⁴, 2003).

S. aureus é, sem dúvida, o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. É encontrado no ambiente externo e em fossas nasais de 20% a 40% dos adultos. Embora esse microorganismo possa formar parte da microbiota humana normal, pode produzir infecções oportunistas importantes em condições apropriadas. Os fatores que podem predispor um indivíduo a infecções cutâneas graves por *S. aureus* incluem alterações quimiotáticas dos leucócitos, tanto congênitas (Síndrome de Wiskott-Aldrich, Síndrome de Down, Síndrome de Job) quanto adquiridas (diabetes melito, artrite reumatóide), alterações na opsonização por anticorpos (hipogamaglobulinemia); alterações na destruição intracelular das bactérias após fagocitose (doença granulomatosa crônica), lesões cutâneas (queimaduras, incisões cirúrgicas, eczema), presença de corpos estranhos (suturas, cateteres endovenosos, próteses), infecções por outros agentes, em particular vírus (influenza), doenças crônicas de base como neoplasias malignas,

alcoolismo e cardiopatias e administração profilática ou terapêutica de agentes antimicrobianos. Nessas circunstâncias, *S. aureus* pode causar diversos processos infecciosos, que variam desde infecções cutâneas crônicas relativamente benignas até infecções sistêmicas fatais (KLUYTMANS et al.⁸¹, 1997; BROOK¹⁶, 2002; MORAN et al.¹⁰⁷, 2005).

As infecções estafilocócicas geralmente superficiais e discretas na maioria dos indivíduos adultos sistemicamente saudáveis, podem ser graves em recém-nascidos, pacientes cirúrgicos, pacientes submetidos à hemodiálise e em portadores de doenças debilitantes como câncer, osteomielite, artrite e diabetes (DARINI et al.³⁴, 1994; PATTI et al.¹²², 1994; ÖHMAN et al.¹¹⁸, 1995; KONEMAN et al.⁸⁵, 2001; PENÃFIEL et al.¹²³, 2003; CHANG et al.²⁴, 2004; MEMMEL et al.¹⁰², 2004).

O gênero *Staphylococcus* apresenta muitos fatores de virulência que estão relacionados com sua capacidade de produzir doenças e disseminar pelos tecidos humanos e de outros animais. Algumas cepas de *S. aureus* produzem cápsula polissacarídica, e são mais resistentes à fagocitose do que as não capsuladas. A presença dessa cápsula parece estar associada com a capacidade de algumas amostras patogênicas de aderir a cateteres e outros materiais, tornando-se focos de infecção (UENO & JORGE¹⁶⁹, 2006).

Staphylococcus produzem várias enzimas extracelulares e toxinas que também contribuem para sua virulência. A produção de catalase pode atuar inativando peróxido de hidrogênio e radicais livres tóxicos formados no interior das células fagocitárias, após ingestão do mesmo. A coagulase recobre as células bacterianas com fibrina tornando-as resistentes a opsonização e à fagocitose. As fibrinolisinases podem degradar coágulos de fibrina e permitir a disseminação da infecção aos tecidos adjacentes. De modo similar, a hialuronidase hidrolisa a matriz intercelular de mucopolissacarídeos nos tecidos e, portanto, pode atuar disseminando os microrganismos para áreas contíguas. Estudos imunológicos e de especificidade de substrato indicam que *S. aureus*

produz ao menos três tipos diferentes de β -lactamases. A produção dessas enzimas pode ser indutiva (produzidas apenas em presença de antibióticos β -lactâmicos) ou constitutiva (produzidas continuamente) e torna o microrganismo resistente à penicilina e ampicilina (GOLEMI-KOTRA et al.⁵⁰, 2003; BURTS et al.¹⁷, 2005).

As hemolisinas produzidas por *S. aureus* são classificadas em α (alfa), β (beta), δ (delta) e γ (gama) e possuem várias atividades biológicas. A α -hemolisina tem ação letal sobre uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo leucócitos polimorfonucleares humanos, e pode lisar eritrócitos de várias espécies animais. Essa toxina é responsável pelo halo de eritrócitos hemolisados que se observa ao redor das colônias de algumas cepas de *S. aureus* desenvolvidas em ágar sangue de carneiro. A β -hemolisina é uma esfingomielinase, tóxica para eritrócitos, leucócitos, macrófagos e fibroblastos. Suas propriedades hemolíticas são incrementadas pela subsequente exposição dos eritrócitos a baixas temperaturas. A δ -hemolisina apresenta propriedade hidrofóbica, promove a ruptura da membrana celular facilitando a penetração nas células do hospedeiro. A γ -hemolisina produz lise de eritrócitos e células linfoblásticas (HEBERT & HANCOCK⁶², 1985; CAIAZZA & O'TOOLE¹⁸, 2003).

Outras toxinas produzidas por esses microrganismos incluem as leucocidinas, que exercem efeito tóxico direto sobre a membrana dos leucócitos polimorfonucleares humanos, causando degranulação do citoplasma, edema celular e lise; as toxinas epidermolíticas, que apresentam atividade proteolítica e dissolvem a matriz mucopolissacarídica da epiderme e são responsáveis pela “Síndrome estafilocócica da pele escaldada”; as enterotoxinas, que são moléculas termoestáveis responsáveis pelas características clínicas da intoxicação estafilocócica alimentar e a toxina da síndrome do choque tóxico 1 (TSST-1) (YAMASAKI et al.¹⁸¹, 2005).

2.8 Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae

As bactérias da família Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae pertencem a microbiota intestinal humana, sendo isoladas também do solo, água e vegetação (MURRAY et al.¹¹², 2000; SMITH & IGLEWSKI¹⁵⁷, 2000). Esses microrganismos podem atuar como patógenos oportunistas em larga faixa de infecções humanas (LAFORCE et al.⁸⁹, 1976; SLOTS et al.¹⁵³, 1990) e sua capacidade de causar infecção é variável, não somente entre espécies do mesmo gênero, mas entre cepas da mesma espécie (SMITH & IGLEWSKI et al.¹⁵⁷, 2003; MOKADY et al.¹⁰⁴, 2005).

2.8.1 Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é composta por bacilos Gram-negativos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, móveis (flagelos peritríquios) ou imóveis. Representa a maior e mais heterogênea família de bacilos Gram-negativos de importância clínica, sendo descritos trinta gêneros e mais de cento e vinte espécies com inúmeros sorotipos (HOLT et al.⁶⁷, 1994; UENO & JORGE¹⁶⁸, 2006). Estes gêneros foram classificados com base nas propriedades bioquímicas, estrutura antigênica e hibridização e seqüenciamento dos ácidos nucléicos. Apesar da complexidade desta família, mais de 95% dos microrganismos isolados clinicamente importantes pertencem a apenas dez gêneros e incluem menos de 25 espécies (Quadro 6) (MURRAY et al.¹¹², 2000).

Quadro 6 – Gêneros e principais espécies de Enterobacteriaceae correlacionados com patogenicidade¹¹²

Gênero	Patogenicidade	Principais espécies
<i>Escherichia</i>	Meningite, gastroenterite, infecção das vias urinárias e septicemia	<i>E. coli</i>
<i>Salmonella</i>	Enterite, septicemia, febre entérica (febre tifóide e paratifóide)	<i>S. typhi</i> , <i>S. paratyphi</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. schottmuelleri</i> , <i>S. hirschfeldii</i>
<i>Shigella</i>	Shigelose, caracterizada por cólicas abdominais, diarreia, febre e fezes sanguinolentas	<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> e <i>S. sonnei</i>
<i>Yersinia</i>	Peste bubônica, enterocolite difusa, linfadenite mesentérica	<i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>
<i>Enterobacter</i>	Oportunistas em queimaduras, feridas, trato urinário, septicemia e meningite	<i>E. cloacae</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. agglomerans</i>
<i>Klebsiella</i>	Oportunistas em pneumonia e septicemia, infecções do trato urinário, indivíduos após antibioticoterapia de amplo espectro	<i>K. pneumoniae pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae ozaenae</i> , <i>K. pneumoniae rhinoscleromatis</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. terrigena</i> , <i>K. planticola</i> , <i>K. ornithinolytica</i>
<i>Citrobacter</i>	Patógenos em seres humanos comprometidos pela idade ou procedimentos invasivos, meningite e abscessos cerebrais em neonatos	<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i> , <i>C. amalonaticus</i>
<i>Serratia</i>	Infecções hospitalares oportunistas, infecção do trato urinário, feridas, pneumonia.	<i>S. marcescens</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. rudidaea</i> , <i>S. plymutica</i> , <i>S. odorifera</i>
<i>Proteus</i>	Infecções das vias urinárias	<i>P. mirabilis</i>
<i>Morganella</i>	Infecções hospitalares em indivíduos imunocomprometidos	<i>M. morganii</i>

Antes do advento dos antibióticos, da quimioterapia e das medidas imunossupressoras, as doenças infecciosas causadas por Enterobacteriaceae estavam relativamente bem definidas. As síndromes diarréicas e disentéricas, acompanhadas por febre e septicemia nos

casos clássicos de febre tifóide, eram causadas por espécies de *Salmonella* e *Shigella*. Os casos de pneumonia clássica, caracterizados pela produção de escarro vermelho-tijolo ou “geléia de groselha”, eram causados por *Klebsiella pneumoniae* (bacilo de Frielander). *Escherichia coli*, espécies de *Proteus* e vários membros do grupo *Klebsiella-Enterobacter* eram comumente isolados de feridas traumáticas, contaminadas com terra ou material vegetal, ou de incisões abdominais após cirurgias gastrointestinais. Atualmente, os membros da família Enterobacteriaceae podem ser suspeitos em qualquer tipo de doença infecciosa. Indivíduos imunocomprometidos ou debilitados são altamente susceptíveis às infecções adquiridas nos hospitais, após a colonização com cepas ambientais ou contaminação a partir de procedimentos invasivos, como cateterismo, broncoscopia, colposcopia ou biópsia cirúrgica (KONEMAN et al.⁸⁵, 2001).

Os microrganismos pertencentes à família Enterobacteriaceae são bastonetes Gram-negativos curtos de 0,3 a 1µm de largura por 1 a 6µm de comprimento. Sua morfologia típica é observada durante o crescimento em meios sólidos *in vitro*, sendo altamente variável em amostras clínicas. Todos os membros podem crescer rapidamente em condições aeróbias ou anaeróbias em meios de peptona ou extrato de carne, sem adição de cloreto de sódio ou de outros suplementos como em ágar MacConkey. Tipicamente, estes microrganismos produzem colônias secas ou mucóides relativamente grandes, de cor acinzentada em ágar sangue, sendo a presença de hemólise variável. As colônias que aparecem vermelhas em ágar MacConkey ou possuem um brilho verde em agar eosina-azul-de-metileno indicam que o microrganismo é capaz de formar ácido a partir de lactose no meio (FILIIUS et al.⁴³, 2003).

Fermentam a glicose em lugar de oxidá-la, quase sempre com produção de gás, são catalase-positivos, oxidase-negativos e reduzem nitrato a nitrito. A ausência da atividade da citocromo-oxidase

constitui uma importante característica, utilizada para distinguir Enterobacteriaceae de outros bacilos Gram-negativos fermentadores e não fermentadores (GOKARN et al.⁴⁹, 2000; CORKER & POOLE²⁹, 2003; ZAID et al.¹⁸⁵, 2003; CRACK et al.³⁰, 2004).

Entretanto a diferenciação das espécies de Enterobacteriaceae baseia-se principalmente na presença ou não de diferentes enzimas codificadas pelo material genético dos cromossomos bacterianos. Os substratos com os quais essas enzimas podem reagir são incorporados no meio de cultura, juntamente com um indicador, que pode detectar a utilização do substrato ou a presença de produtos metabólicos específicos (SOGAARD et al.¹⁶¹, 2005).

São microrganismos ubíquos encontrados em todo o mundo no solo, na água, na vegetação, e fazem parte da microbiota intestinal normal da maioria dos animais, incluindo os seres humanos. Podem produzir uma grande variedade de doenças humanas, incluindo septicemia, endocardite, infecções urinárias e intestinais. O aumento dessas infecções pode ser evidenciado em decorrência do uso indiscriminado de antibióticos, quimioterapia, terapia com imunossupressores e em indivíduos com comprometimento do sistema imunológico (AGARWAL et al.², 2005; BRANGER et al.¹³, 2005). Espécies de *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia pestis* estão associadas freqüentemente a infecções em seres humanos, enquanto outras como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* são membros da microbiota normal que podem, eventualmente, causar infecções oportunistas (ENDIMIANI et al.⁴⁰, 2005; LOWELL et al.⁹⁴, 2005; PEROMINGO-MATUTE et al.¹²⁵, 2005; MOKADY et al.¹⁰⁴, 2005; NIYOGI¹¹⁵, 2005; PÉREZ-SÁNCHEZ et al.¹²⁴, 2005; SILVA et al.¹⁵², 2005). As infecções podem originar-se de um reservatório animal, de um portador humano ou por disseminação endógena dos microrganismos em um indivíduo susceptível (VELGE et al.¹⁷¹, 2005).

Enterobactérias apresentam variações significativas na sua capacidade de causar doenças. O grau de virulência desses microrganismos reflete além das características de cada espécie em particular, o número necessário para produzir infecção. A maior ou menor patogenicidade é determinada pela habilidade de colonização no hospedeiro, potencial de penetração em superfícies mucosas, invasão e multiplicação nos tecidos e capacidade de inibir os mecanismos de defesa locais ou sistêmicos do hospedeiro. Alguns fatores presentes nestes microrganismos são determinantes de sua patogenicidade, tais como adesinas, lipopolissacarídeos, polissacarídeos capsulares, bacteriocinas e plasmídeos (NAVEEN & MATHAI¹¹⁴, 2005).

A resistência aos antibióticos pode aparecer em isolados clínicos, antes sensíveis, por meio da transferência de plasmídeos conhecidos como plasmídeos R ou fatores R. As bactérias entéricas Gram-negativas possuem comumente um único e grande plasmídeo R que codifica para a resistência a vários antibióticos (MOTTA et al.¹¹⁰, 2003). Uma porcentagem crescente de cepas dos gêneros *Enterobacter*, *Serratia*, e *Klebsiella*, cepas de *Proteus* e cepas cefalotina-resistentes de *E. coli*, possuem β -lactamases induzíveis que proporcionam resistência cruzada com muitos antibióticos β -lactâmicos (PITOUT et al.¹²⁷, 1997; KAYE et al.⁷⁵, 2004; WACHINO et al.¹⁷⁴, 2004; PITOUT et al.¹²⁸, 2005; VELGE et al.¹⁷¹, 2005).

2.8.2 Pseudomonadaceae

O gênero *Pseudomonas* compreende mais de cem espécies pertencente à família Pseudomonadaceae. Podem ser encontrados no meio ambiente, incluindo solo, matéria orgânica em decomposição, vegetação e na água. Muitos destes microrganismos são

patógenos em plantas e podem ser encontrados em vários tipos de alimentos, animais e seres humanos. A ampla distribuição ambiental de *Pseudomonas* é assegurada por suas exigências simples para crescimento. Muitos compostos orgânicos podem ser utilizados como fonte de carbono e nitrogênio, e algumas cepas podem até mesmo crescer em água destilada, utilizando diminutas quantidades de nutrientes. Apesar de sua presença ubíqua, capacidade de crescimento em praticamente qualquer ambiente, fatores de virulência e ampla resistência antimicrobiana, estes microrganismos não são patógenos comuns uma vez que infecções por *Pseudomonas* são basicamente oportunistas (SMITH & IGLEWSKI¹⁵⁷, 2003). Dentre as espécies deste gênero, *Pseudomonas aeruginosa* é a mais importante, entretanto, outras espécies também podem agir como oportunistas (SECKO¹⁴⁹, 2005).

Microrganismos do gênero *Pseudomonas* são bacilos Gram-negativos retos ou ligeiramente curvos (0,5 a 1 µm de largura por 1 a 5 µm de comprimento) e móveis em virtude da presença de flagelos polares. Utilizam glicose e outros carboidratos oxidativamente e em geral são citocromo-oxidase positivos. A presença da citocromo-oxidase em *Pseudomonas* é utilizada para diferenciar estas bactérias das Enterobacteriaceae (OBERHOFER¹¹⁶, 1981; WHITELEY et al.¹⁷⁶, 1996; FUHRER et al.⁴⁶, 2005). Embora estes microrganismos sejam definidos como aeróbios obrigatórios, podem crescer em condições anaeróbias (ENOCH et al.⁴¹, 2004).

O gênero consiste em numerosas espécies diferentes, subdivididas de acordo com suas diferenças bioquímicas e genéticas em três grupos: fluorescente, stutzeri e alcaligenes (Quadro 7) (KONEMAN et al.⁸⁵, 2001).

Quadro 7 - Grupos e principais espécies do gênero *Pseudomonas*⁸⁵.

Grupo	Principais espécies
Fluorescente	<i>P. aeruginosa</i>
	<i>P. fluorescens</i>
	<i>P. putida</i>
Stutzeri	<i>P. stutzeri</i>
	<i>P. mendocina</i>
Alcaligenes	<i>P. alcaligenes</i>
	<i>P. pseudoalcaligenes</i>

P. aeruginosa cresce em diversos meios de cultura, produzindo, algumas vezes odor adocicado, semelhante à uva ou milho. Formam colônias redondas e lisas de coloração esverdeada fluorescente, e algumas cepas produzem hemólise (OBERHOFER¹¹⁶, 1981; ENOCH et al.⁴¹, 2004). Com freqüência, produz pigmento azulado não-fluorescente piocianina, que se difunde no ágar. Muitas amostras de *P. aeruginosa* também produzem pigmento fluorescente pioverdina, que confere ao ágar uma coloração esverdeada. Algumas cepas produzem pigmento vermelho-escuro (piorrubina), ou pigmento negro (piomelanina) (OBERHOFER¹¹⁶, 1981).

Em cultura, *P. aeruginosa* pode produzir múltiplos tipos de colônias, dando a impressão de uma cultura de espécies mistas de bactérias. Nestes casos também podem exibir diferentes atividades bioquímicas e enzimáticas, bem como diferentes padrões de sensibilidade a agentes antimicrobianos. *P. aeruginosa* cresce bem ente 37 a 42° C, sendo que seu crescimento a 42° C ajuda a diferenciá-la de outras espécies. É oxidase-positiva, não fermenta carboidratos, porém muitas cepas oxidam glicose. Em geral, a identificação baseia-se na morfologia das colônias, na positividade da oxidase, na presença de pigmentos característicos e no crescimento a 42° C. A diferenciação de *P.*

aeruginosa de outras espécies com base na sua atividade bioquímica exige a realização de testes com grande número de substratos (OBERHOFER¹¹⁶, 1981; OHKUSU¹¹⁷, 2000; ENOCH et al.⁴¹, 2004; KIRISITS et al.⁷⁹, 2005).

P. aeruginosa é um patógeno oportunista de grande importância no ambiente hospitalar, principalmente por sua fácil disseminação e resistência a antibióticos e desinfetantes. Tem se colocado no lugar de *Staphylococcus aureus* como causa primária de infecções hospitalares, uma vez que adquirem facilmente genes que conferem resistência aos antimicrobianos (AGARWAL et al.², 2005; VITKAUSKIENE et al.¹⁷³, 2005; MATHUR et al.¹⁰⁰, 2005).

Representa um problema particular para pacientes com neutropenia, podendo causar septicemia fulminante e morte. Pode produzir infecção do trato respiratório em indivíduos que necessitam permanecer longo período sob ventilação artificial. A infecção é especialmente prevalente entre indivíduos com queimaduras, fibrose cística, câncer ou transplante de órgãos (HA & JIN⁵⁴, 1999; GROSS & CHRISTENSEN⁵³, 2000; KIM et al.⁷⁶, 2001; BERGHMANS et al.¹², 2003; SANTANA et al.¹⁴¹, 2003). As infecções são em geral observadas em sítios onde existe tendência ao acúmulo de umidade: traqueostomias, cateteres permanentes, feridas cutâneas exsudativas (GIACOMETTI et al.⁴⁷, 2000; RUIFY et al.¹³⁸, 2001; TSENG et al.¹⁶⁷, 2002).

3 PROPOSIÇÃO

A proposta do presente estudo foi avaliar a presença de leveduras, estafilococos, enterobactérias e pseudomonas na cavidade bucal e em sulco gengival/bolsa periodontal de indivíduos submetidos à terapia antibiótica utilizada no tratamento de tuberculose pulmonar e indivíduos controle.

4 MATERIAL E MÉTODO

O projeto de pesquisa foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, sob protocolo nº 089/2003-PH/CEP (Anexo A). Todos os indivíduos que concordaram em participar do estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo B).

4.1 População estudada

4.1.1 Grupo Tuberculose

Foram incluídos no presente estudo cinquenta indivíduos previamente diagnosticados com tuberculose pulmonar no Ambulatório de Tisiologia da Policlínica II do Departamento de Saúde da Prefeitura Municipal de Taubaté e no Ambulatório Regional de Especialidades de Taubaté e que estivessem sendo submetidos a antibioticoterapia por um período mínimo de 45 dias e máximo de seis meses.

Foram excluídos do estudo indivíduos HIV-positivos, diabéticos não metabolicamente controlados, gestantes e lactantes.

4.1.2 Grupo Controle

Foram incluídos no presente estudo cinquenta indivíduos sistemicamente saudáveis, de forma pareada, (com faixa etária, gênero e

condição bucal semelhantes) com os indivíduos do grupo tuberculose, provenientes do Posto de Atendimento Médico-Odontológico do Belém da Prefeitura Municipal de Taubaté.

Foram excluídos deste grupo indivíduos HIV-positivos, diabéticos não metabolicamente controlados, gestantes, lactantes e indivíduos que tivessem sido submetidos a terapia antimicrobiana nos últimos seis meses previamente a coleta.

4.1.3 Anamnese e exame clínico

Durante a realização da anamnese foram registrados os dados pessoais e as condições de saúde geral de todos os indivíduos incluídos no estudo (Apêndices A e B). Para os indivíduos do grupo tuberculose, foram registrados também a associação de antibióticos utilizada e o tempo de tratamento no momento da coleta.

Todos os indivíduos incluídos no estudo foram submetidos a exame clínico para avaliação das condições de saúde bucal. Quando necessário, os indivíduos foram encaminhados para tratamento odontológico nos Postos de Atendimento Médico-Odontológico da Prefeitura Municipal de Taubaté.

4.2 Coleta e processamento das amostras

A coleta de material da cavidade bucal foi realizada pela técnica de enxágüe bucal, utilizando-se 10 mL de solução fisiológica esterilizada (NaCl a 0,9%) tamponada com fosfato (PBS 0,1M e pH 7,2) contida em um recipiente universal descartável. Os indivíduos realizaram bochecho com a solução durante um minuto, devolvendo em seguida a solução para o mesmo recipiente.

Para coleta de material subgengival foram selecionados dois sítios em cada indivíduo. Após a remoção do biofilme supragengival com compressa de gaze esterilizada e isolamento relativo da região com roletes de algodão, as amostras de material subgengival foram obtidas com cones de papel absorvente nº 30 (Tanari). Foram inseridos três cones na porção mais apical do sulco gengival/bolsa periodontal de cada sítio selecionado. Os cones foram mantidos no local por 30 segundos e, em seguida, acondicionados em tubos plásticos (*Eppendorf*) esterilizados contendo 1 mL de solução fisiológica (NaCl a 0,85%) tamponada com fosfato 0,1M e pH 7,2 (PBS) esterilizada.

Os recipientes foram mantidos em gelo até serem transportados para o laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, respeitando-se o período máximo de 3 horas entre coleta e processamento das amostras.

As amostras de enxágüe bucal foram centrifugadas por 10 minutos a 8000 Xg e o sobrenadante foi descartado. O depósito foi ressuspensionado em 2,5 mL de PBS e misturado em agitador de tubos (Vortex) por 30 segundos, produzindo assim a suspensão de concentração final.

As amostras coletadas de sulco gengival/bolsa periodontal foram homogeneizadas em agitador de tubos (Vortex) durante 30 segundos. Os cones foram desprezados com auxílio de pinças esterilizadas. Cada amostra foi centrifugada por 10 minutos a 8000 Xg e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o depósito foi ressuspensionado em 0,6 mL de PBS e a amostra foi novamente homogeneizada em agitador de tubos (Vortex) por 30 segundos, produzindo assim a suspensão de concentração final.

De cada amostra (suspensão de concentração final) foi semeado 0,1 mL em duplicata em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose (Difco) acrescido de 0,1 mg/mL de cloranfenicol (União Química Farmacêutica Nacional SA), ágar Manitol (Difco) e ágar

MacConkey (Difco). As placas foram incubadas a 37° C durante 48 horas. Após este período, quando não houve crescimento nas placas de Sabouraud dextrose com cloranfenicol, estas permaneceram por mais cinco dias a temperatura ambiente.

Após o crescimento, as colônias foram examinadas quanto às características morfológicas (tamanho, forma, superfície, bordos, halos e presença de pigmentos) e as colônias características foram contadas, obtendo-se o número de unidades formadoras de colônias. A partir deste valor foi calculado o número de UFC/mL. Para cada colônia com morfologia diferente foram realizados esfregaços em lâminas e corados pelo método de Gram.

Para obtenção de culturas puras as colônias sugestivas de leveduras foram semeadas em tubos de ensaio contendo ágar Sabouraud dextrose e incubadas por 24 horas a 37° C; as colônias de cocos Gram-positivos e de bacilos Gram-negativos foram semeadas em tubos de ensaio contendo ágar Gelose e incubadas por 24 horas a 37° C.

4.3 Identificação das amostras de *Candida*

As culturas puras obtidas foram identificadas baseando-se em Sandvén¹⁴⁰ (1990) e Williams & Lewis¹⁷⁷ (2000). Para controle foi utilizada a cepa padrão de *C. albicans* (ATCC 18804).

4.3.1 Formação de tubo germinativo

Para a verificação da formação de tubo germinativo foi adicionada uma alçada da cultura de 24 horas da levedura em tubo de ensaio (13 x 170 mm) contendo 0,5 mL de soro estéril de coelho. Este tubo foi mantido em banho-maria a 37° C pelo período de no mínimo 2 e máximo de 3 horas. A formação de tubo germinativo foi observada em

microscopia de luz (400X) colocando-se uma gota da suspensão entre lâmina e lamínula.

4.3.2 Microcultivo

O microcultivo foi realizado para verificar a produção de hifas/pseudohifas e clamidoconídeos, utilizando-se o meio *Corn Meal Agar* (Difco) acrescido de 1% de Tween 80. Para a realização do microcultivo o meio *Corn Meal Agar* foi previamente fundido e distribuído em lâminas de vidro colocadas no interior de placas de Petri esterilizadas. Após a solidificação do ágar, cada amostra de levedura a ser testada foi semeada em estria única na superfície do meio e colocada uma lamínula no centro da lâmina. No fundo de cada placa foi colocado um pedaço de papel filtro esterilizado e umedecido em água esterilizada, para evitar possível dessecação do meio de cultura. O conjunto foi incubado por 48 a 72 horas em temperatura ambiente, quando então foi realizada a leitura em microscopia de luz (400X).

4.3.3 Fermentação de carboidratos

Para a realização desta prova foi utilizado caldo vermelho de fenol (Difco), distribuído em tubos de ensaio contendo tubos de Durhan em seu interior, adicionado de cada carboidrato (glicose, maltose, sacarose, galactose e lactose) na concentração de 1% e autoclavados a 120° C por 15 minutos. Os tubos foram semeados a partir de uma cultura pura de 24 horas da levedura em ágar Sabouraud dextrose. A leitura foi realizada após 48 horas e uma semana da incubação a 37° C, verificando-se a mudança de coloração de vermelho (negativo) para

amarelo (positivo) pela viragem de pH em decorrência da produção de ácido, e a produção de gás no interior dos tubos de Durhan (Figura 1).

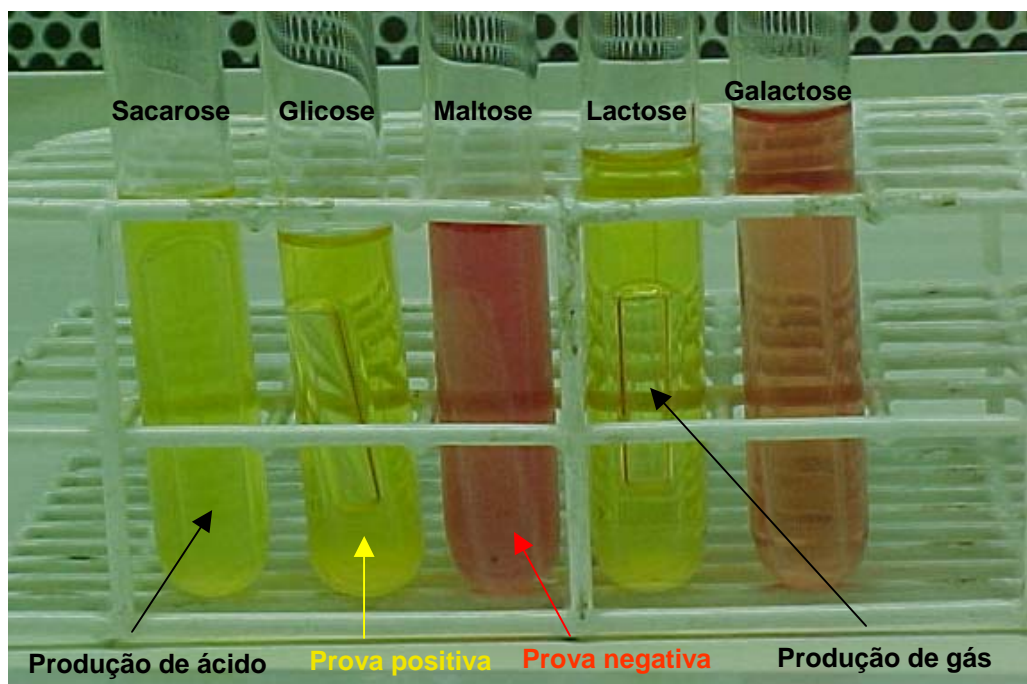


FIGURA 1 – Prova de fermentação de carboidratos utilizada para diferenciação bioquímica de leveduras do gênero *Candida*. Tubos contendo meio de cultura caldo vermelho de fenol com tubos de Durhan no interior. Observa-se a produção de ácido quando da mudança de cor de vermelho para amarelo (seta) e produção de gás no interior do tubo de Durhan (seta).

4.3.4 Assimilação de carboidratos (Auxonograma)

Para a verificação da assimilação de carboidratos pelas amostras de leveduras, foi utilizado meio de cultura quimicamente definido, com constituição conforme o Quadro 8.

Quadro 8- Constituição do meio de cultura quimicamente definido, utilizado para assimilação de carboidratos das amostras de leveduras.

Constituintes	Quantidade
Sulfato de amônia (Merck)	5 g
Sulfato ácido de potássio (Sigma)	1 g
Sulfato de magnésio (Sigma)	0,5 g
Ágar (Difco)	15 g
Água destilada	1000 mL

O meio foi distribuído em tubos de ensaio (20 mL) e autoclavado a 120° C por 15 minutos. Para cada amostra a ser testada, foi feita uma suspensão da levedura com turvação equivalente ao tubo número dez da escala de MacFarland, a qual foi semeada em *pour plate* no meio descrito acima. A seguir, foi colocado na superfície do meio um disco de papel filtro embebido numa solução de 10% dos seguintes açúcares: glicose, galactose, lactose, maltose, sacarose e rafinose (Figura 2). O crescimento da amostra nas proximidades do açúcar significou que o microrganismo assimilou-o como fonte de carbono.

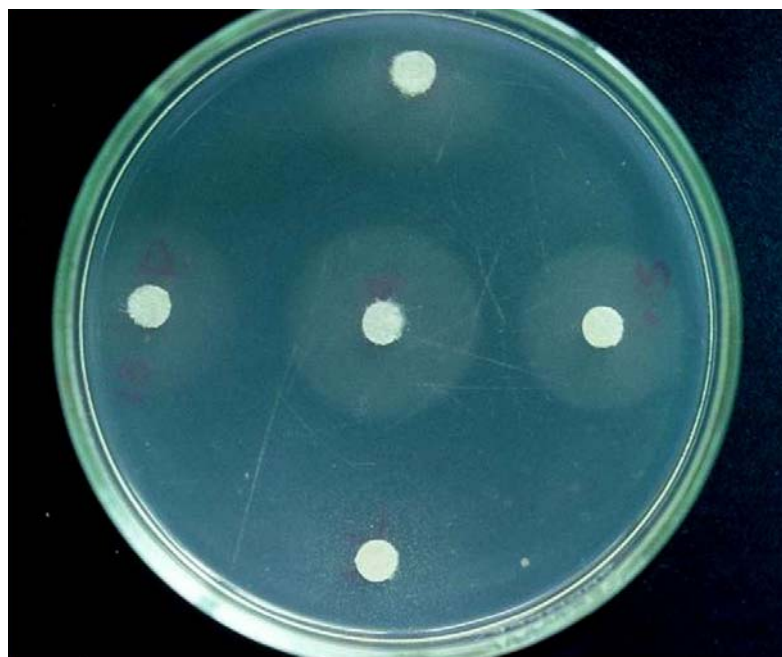


FIGURA 2 – Prova de assimilação de carboidratos utilizada para diferenciação bioquímica de leveduras do gênero *Candida*. Placa contendo meio de cultura quimicamente definido com discos de papel filtro na superfície impregnados com os carboidratos na concentração de 10%.

As amostras foram caracterizadas em espécies de acordo com as características de produção de tubo germinativo em soro estéril de coelho, produção de pseudohifas e clamidoconídeos em *Corn Meal Agar*, fermentação e assimilação de carboidratos, baseando-se em Sandvén¹⁴⁰ (1990), Williams & Lewis¹⁸⁰ (2000) e Koga-Ito et al.⁸² (2006), conforme Quadro 9.

Quadro 9 – Classificação das espécies de *Candida* de acordo com a formação de tubo germinativo (TG), produção de clamidoconídeos (CI) e hifas (Hf), fermentação e assimilação de carboidratos^{82, 140, 180}.

Espécies de <i>Candida</i>	TG	CI	Hf	Fermentação					Assimilação					
				GL	S	M	L	GA	GL	S	M	L	GA	R
<i>C. albicans</i>	+	+	+	A/G	A/-	A/G	-/-	A/G	+	+	+	-	+	-
<i>C. stellatoidea</i>	V	V	+	A/G	A/-	A/G	-/-	A/G	+	-	+	-	+	-
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	-/-	A/G	+	+	+	-	+	+
<i>C. glabrata</i>	-	-	-	A/G	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. krusei</i>	-	-	+	A/G	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. lipolytica</i>	-	-	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+	-	-	-	-	-
<i>C. lusitaniae</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	-/-	A/G	+	+	+	-	+	-
<i>C. parapsilosis</i>	-	-	+	A/G	-/-	-/-	-/-	V	+	+	+	-	+	-
<i>C. tropicalis</i>	-	V	+	A/G	A/G	A/G	-/-	V	+	+	+	-	+	-
<i>C. kefyr</i>	-	-	+	A/G	A/G	-/-	A/G	A/G	+	+	-	+	+	-

GL: glicose; S: sacarose; M: maltose; L: lactose; GA: galactose; R: rafinose

A: produção de ácido; G: produção de gás

(+): prova positiva; (-): prova negativa; V: prova variável

4.4 Identificação das amostras de *Staphylococcus* spp.

As culturas puras de *Staphylococcus* spp. foram identificadas baseando-se em Koneman et al.⁸⁵ (2001), realizando-se as seguintes provas:

4.4.1 Produção da enzima catalase

Para verificação da produção da enzima catalase as culturas puras foram semeadas em tubos de ensaio contendo caldo de infusão cérebro-coração (*Brain Heart Infusion Agar* - Difco) e incubadas a

37° C durante 24 horas. Após esse período, foi adicionado 1 mL de peróxido de hidrogênio (Rioquímica Indústria Farmacêutica Ltda) a 10 V. A prova foi considerada positiva quando da formação de bolhas de oxigênio, indicativo da presença da enzima catalase (OPLUSTIL et al.¹²⁰, 2000).

4.4.2 Produção da enzima coagulase

A produção da enzima coagulase foi verificada por meio da adição de 0,25 mL de plasma humano em 0,5 mL da cultura de 24 horas em caldo de infusão cérebro-coração (*Brain Heart Infusion Agar* – Difco). A prova foi considerada positiva quando da verificação da formação do coágulo de fibrina (Figura 3). As verificações foram feitas após uma, duas, três e quatro horas de incubação em banho-maria a 37° C. Foram consideradas para identificação pelas provas bioquímicas a seguir as espécies de estafilococos coagulase-positivas. As cepas de estafilococos coagulase-negativas foram identificadas utilizando-se o sistema API Staph (*Bio-Merieux*, França).

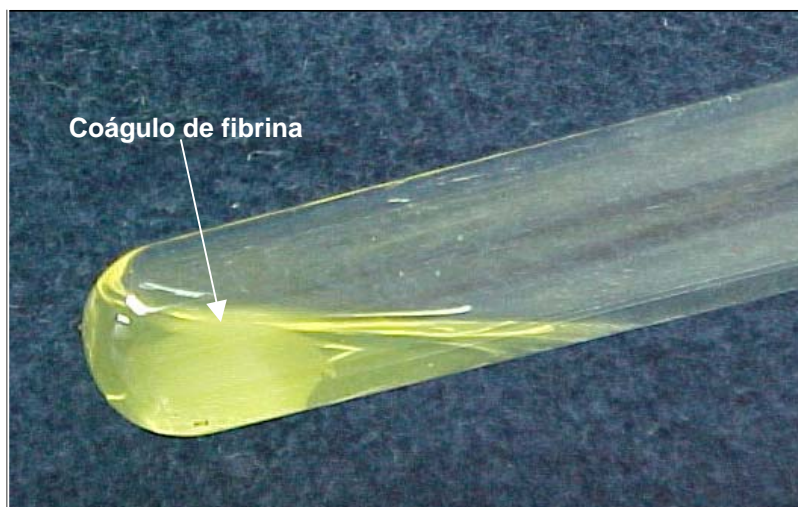


FIGURA 3 – Prova de verificação de produção da enzima coagulase utilizada para diferenciação bioquímica de *Staphylococcus* spp. em plasma humano. Observa-se formação de coágulo de fibrina (seta) quando da produção da enzima coagulase.

4.4.3 Identificação das amostras de estafilococos coagulase-positivas

- a) produção de ácido a partir da D-trealose - a fermentação de D-trealose foi realizada em tubos de coluna alta contendo caldo vermelho de fenol (Difco) acrescido de 1,5% de ágar (meio semi-sólido) e autoclavados a 121° C por 15 minutos. O açúcar foi adicionado de forma a obter concentração de 1%. As cepas previamente cultivadas em ágar TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco) a 37° C por 24 horas foram semeadas em profundidade com agulha de platina e a seguir incubadas a 37° C. A prova foi considerada positiva pela viragem de pH, onde foi verificada a mudança da cor vermelha (negativo) para a amarela (positivo) (Figura 4);

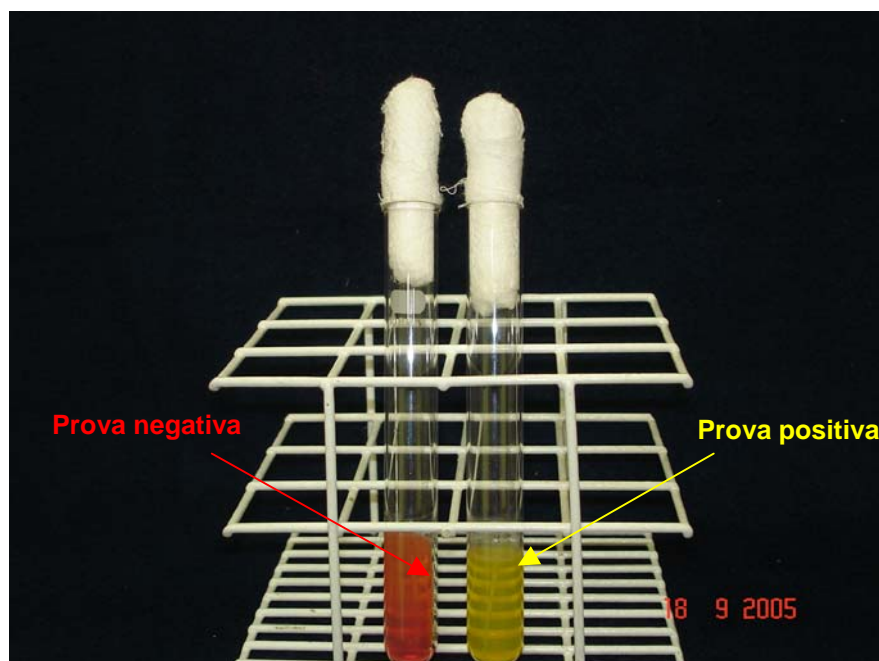


FIGURA 4 – Prova de produção de ácido a partir da D-Trealose utilizada para diferenciação bioquímica de estafilococos coagulase-positiva. Tubos de coluna alta contendo meio de cultura caldo vermelho de fenol acrescido de ágar e D-Trealose a 1%. Observa-se produção de ácido quando da mudança de cor de vermelho (prova negativa) para amarelo (prova positiva) (seta).

b) Voges-Proskauer - o teste Voges-Proskauer (VP) foi utilizado para verificar se a bactéria produz butilenoglicol como produto final de fermentação da glicose. Cada cultura pura foi semeada em TSA (*Tryptic Soy Agar*, Difco) e incubada a 37° C por 24 horas. Após esse período as culturas foram inoculadas em tubos contendo caldo VP (Difco) e novamente incubadas por 24 horas a 37° C. Após esse período, foram retirados 2,5 mL desse caldo e adicionados 0,6 mL de α -naftol a 5% em álcool absoluto e 0,2 mL de hidróxido de potássio a 40% (reagente de Barrit). A mistura foi agitada para exposição ao oxigênio atmosférico. Foram consideradas positivas as reações que ocorreram nos primeiros cinco minutos através da

verificação de formação do halo de cor vermelha (Figura 5). Todos os tubos negativos foram colocados em repouso e observados após uma hora.

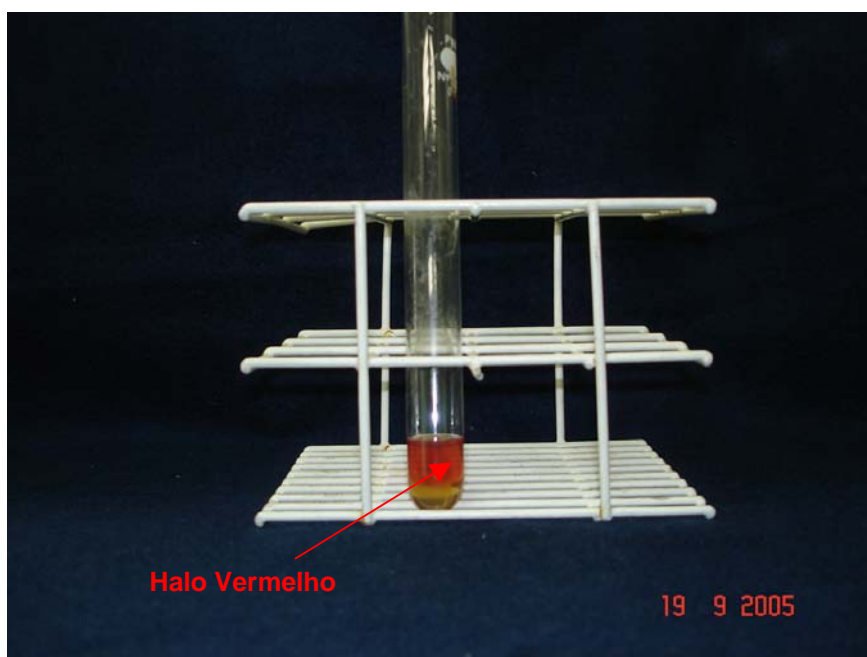


FIGURA 5 – Teste Voges-Proskauer utilizado para diferenciação das amostras de estafilococos coagulase-positiva. Tubos contendo caldo VP adicionado de α -naftol a 5% e hidróxido de potássio a 40%. Observa-se a formação de halo de cor vermelha quando da produção de butilenoglicol como produto final de fermentação da glicose.

Após a verificação dos resultados das provas bioquímicas, as cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivas foram identificadas conforme Quadro 10 (FORBES et al.⁴⁵, 1998). Como controle foi utilizada cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 6538).

Quadro 10- Identificação de *Staphylococcus* coagulase positiva, considerando-se as provas bioquímicas⁴⁵.

Espécies	Catalase	Coagulase	VP	D-trealose	ONPG
<i>S. aureus</i>	+	+	+	+	-
<i>S. intermedius</i>	+	+	-	+	+
<i>S. hyicus</i>	+	+	-	+	-
<i>S. schleiferi</i> (subsp. <i>coagulans</i>)	+	+	+	-	ind.

(+): prova positiva (-): prova negativa ind.: indeterminada
 VP: Voges-Proskauer ONPG: ortonitrofenil β-galactosídeo

4.4.4 Identificação das amostras de estafilococos coagulase-negativas

As amostras de estafilococos coagulase-negativas foram identificadas utilizando-se o sistema API Staph (*Bio-Merieux*, França). O API Staph é um sistema padronizado para a identificação dos gêneros *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Kocuria* que comporta mini-testes bioquímicos e uma base de dados.

A galeria API Staph é constituída de 20 microtubos que contêm os substratos desidratados (Figura 6). Os microtubos foram inoculados com uma suspensão bacteriana preparada em API Staph Medium que reconstitui os testes. A suspensão bacteriana foi preparada a partir de uma cultura recente (18-24 horas), de forma padronizada, com turvação equivalente a 0,5 na escala de McFarland, sendo utilizada imediatamente após o preparo (Figuras 7 a 9).



FIGURA 6 - Galeria de API Staph contendo mini-testes bioquímicos utilizada para identificação de estafilococos coagulase-negativa. Observa-se os microtubos contendo os substratos desidratados (seta).

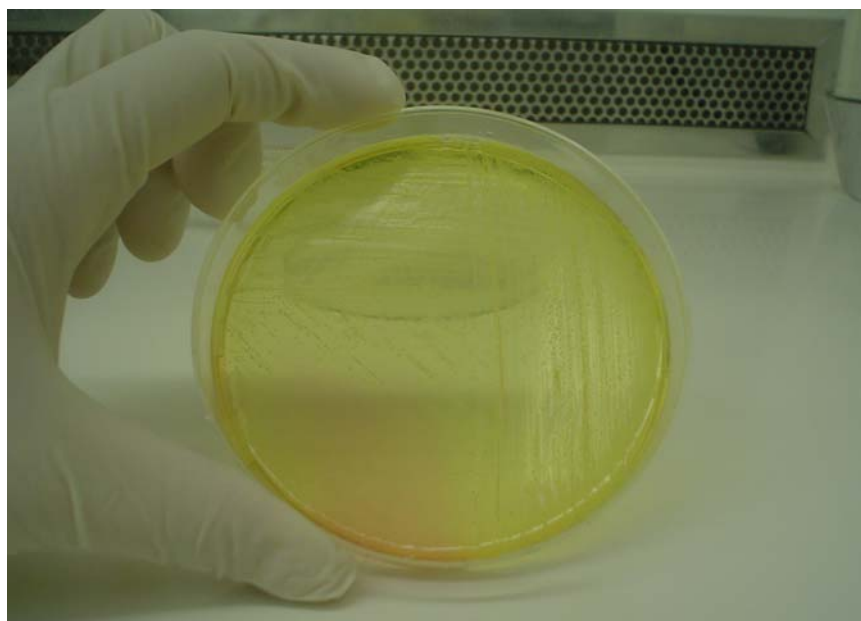


FIGURA 7 – Placa de Petri contendo ágar Manitol utilizado para obtenção da cultura recente da amostra a ser identificada. Observa-se crescimento após 18-24 horas de incubação a 37° C.



FIGURA 8 – Preenchimento dos microtubos da galeria de API Staph com a suspensão bacteriana em API Staph Medium utilizando micropipeta. Observa-se preenchimento unicamente dos tubos e não das cúpulas, sem ultrapassar o nível dos mesmos (seta).

Após a inoculação, as galerias foram incubadas a 37° C por 18 a 24 horas. As reações produzidas durante o período de incubação traduziram-se por alterações colorimétricas espontâneas ou reveladas pela adição de reagentes (Figura 9). A leitura destas reações foi efetuada consultando um quadro de leitura fornecido pelo fabricante. A identificação foi obtida consultando uma base de dados do programa de identificação, a partir de um perfil numérico.

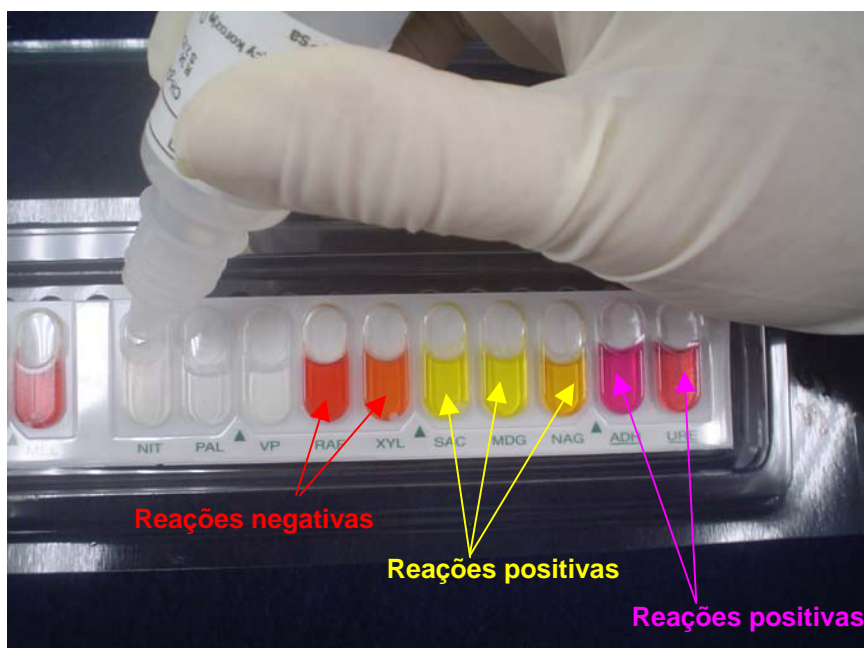


FIGURA 9 – Adição de reagente para revelação das reações bioquímicas nos microtubos da galeria de API Staph inoculada com suspensão bacteriana de estafilococos coagulase-negativa e incubada a 37° C por 18 a 24 horas. Observa-se nos microtubos alterações espontâneas da cor vermelha para amarela e da cor amarela para vermelho/violeta (setas).

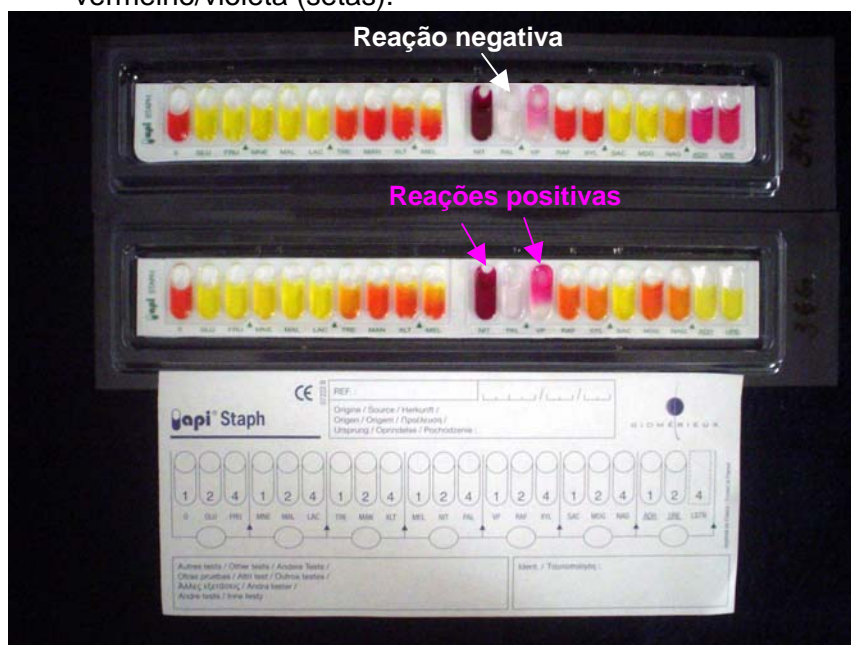


FIGURA 10 – Galerias de API Staph inoculadas com suspensão bacteriana de estafilococos coagulase-negativa após incubação a 37° C por 18 a 24 horas. Observa-se nos microtubos alterações colorimétricas (de incolor/rosa pálido para rosa/violeta) reveladas pela adição de reagentes (setas) e a ficha para anotação dos resultados.

4.5 Identificação das amostras de Enterobactérias e *Pseudomonas*

As amostras de Enterobactérias e *Pseudomonas* foram identificadas utilizando-se o sistema API 20E (*Bio-Merieux*, França). O API 20E é um sistema padronizado para a identificação de Enterobactérias e de outros bacilos Gram-negativos não fastidiosos, constituído de 21 mini-testes bioquímicos e uma base de dados (Figura 11).



FIGURA 11 – Galeria de API 20E contendo 20 mini-testes bioquímicos utilizada para identificação de enterobactérias e bactérias do gênero *Pseudomonas*. Observa-se os microtubos contendo os substratos desidratados (seta).

A galeria API 20E constitui-se de vinte microtubos que contêm os substratos desidratados. As suspensões bacterianas foram preparadas homogeneizando uma única colônia de culturas recentes (18-24 horas) em ágar MacConkey, em tubos de ensaio contendo 5 mL de água destilada estéril (Figuras 12 e 13). Os microtubos foram inoculados com a suspensão bacteriana que reconstitui os testes (Figura 15). Após a inoculação, as galerias foram incubadas a 37° C por 18 a 24 horas. As reações produzidas durante o período de incubação traduziram-se por alterações colorimétricas espontâneas ou reveladas pela adição de

reagentes. A leitura destas reações foi efetuada consultando quadro de leitura fornecido pelo fabricante. A identificação foi obtida consultando uma base de dados do programa de identificação, a partir de um perfil numérico.

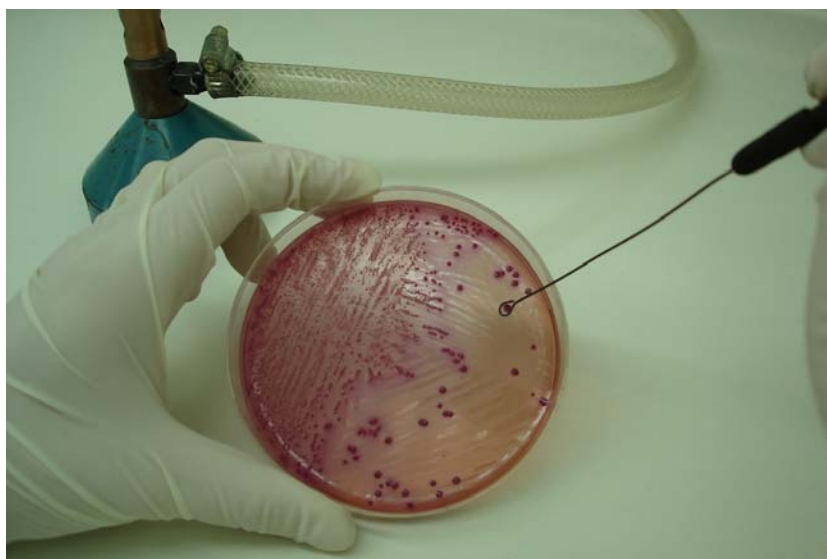


FIGURA 12 – Placa de petri contendo ágar MacConkey utilizado para obtenção da cultura recente da amostra a ser identificada. Observa-se crescimento após 18-24 horas de incubação a 37° C.



FIGURA 13 – Preenchimento dos microtubos da galeria de API 20E com a suspensão bacteriana em água destilada estéril utilizando micropipeta. Observa-se preenchimento unicamente dos tubos e não das cúpulas, sem ultrapassar o nível dos mesmos (seta).

4.6 Análise estatística

Foram determinadas medidas de centralização e dispersão dos valores obtidos de UFC/mL para o grupo tuberculose e controle. Calculou-se o coeficiente de variação (quociente entre o desvio-padrão e a média) pelo fato deste parâmetro, na magnitude encontrada, refletir dados característicos de elevada dispersão em termos relativos a média. Em seqüência aos cálculos da Estatística Descritiva acima citada, foi testada a normalidade de cada um dos grupos utilizando-se o método de Anderson-Darling. Verificou-se uma distribuição de natureza não-normal ("*p-value*" inferior ao nível de 5% adotado para este estudo).

Para se comparar os grupos tuberculose e controle para cada um dos microrganismos estudados, distribuídos de maneira não-normal, o método de comparação empregado foi de natureza não-paramétrica, utilizando-se o teste de Mann-Whitney (também denominado teste da soma de postos de Wilcoxon para duas amostras independentes) com nível de significância de 5%. Todos os estudos estatísticos foram realizados utilizando-se o programa Minitab[®], release 13.

5 RESULTADOS

5.1 População estudada

Foram incluídos no presente estudo cem indivíduos, sendo cinquenta indivíduos no grupo tuberculose e cinquenta indivíduos no grupo controle de forma pareada de acordo com a idade, gênero e condição bucal, sendo 17 indivíduos do gênero feminino (34%) e 33 do gênero masculino (66%), com idade variando entre vinte e 73 anos. A média de idade para os indivíduos do grupo tuberculose foi de 41,94 anos e desvio padrão de 15,29. Para os indivíduos do grupo controle a média foi de 42,1 anos e desvio padrão de 15,28. A distribuição dos indivíduos incluídos no estudo de acordo com gênero e idade está representada no quadro 14 (Apêndice C).

Foi realizado exame clínico para avaliação das condições bucais de todos os indivíduos incluídos no estudo. Os indivíduos incluídos no grupo controle apresentaram condições bucais semelhantes aos indivíduos do grupo tuberculose. O quadro 11 apresenta as condições bucais avaliadas nos indivíduos do grupo tuberculose. Com relação à condição periodontal, observou-se elevada prevalência de indivíduos com sangramento gengival (68%) e perda de inserção clínica (56%). Houve também uma elevada prevalência de indivíduos com ausência de elementos dentários (58%), excluindo-se os terceiros molares desta avaliação, sendo que a média de dentes ausentes na população estudada foi de 5,16.

Quadro 11 – Condições bucais avaliadas nos indivíduos do grupo tuberculose

Condição bucal	Número de indivíduos	Porcentagem
Desdentado total	3	6%
Desdentado total com prótese	1	2%
Desdentado parcial	2	4%
Desdentado parcial com prótese	2	4%
Implantes dentários	0	0
Aparelho ortodôntico	2	4%
Sangramento gengival	34	68%
Perda de inserção clínica	28	56%
Dentes Ausentes*	29	58%

* excluindo-se os terceiros molares

Todos os indivíduos incluídos no grupo tuberculose foram previamente diagnosticados com tuberculose pulmonar e estavam sendo submetidos a antibioticoterapia por um período mínimo de 45 dias e máximo de seis meses no momento da coleta. Todos os indivíduos estavam sendo submetidos ao mesmo esquema terapêutico (esquema básico), que consiste em uma associação de isoniazida (INH), rifampicina (RMP) e pirazinamida (PZA), durante dois meses, seguida por quatro meses com INH e RMP, sendo que este esquema é indicado para todas as formas de tuberculose pulmonar e extrapulmonar. A associação de fármacos utilizada pelos indivíduos incluídos no estudo e o tempo de tratamento no momento da coleta das amostras estão representados no Quadro 12. As dosagens dos fármacos utilizados no tratamento estão representados no Quadro 13.

Quadro 12 – Distribuição de indivíduos do grupo tuberculose de acordo com o esquema terapêutico utilizado e tempo de tratamento

Nº Pac.	Esquema Terapêutico	Tempo (dias)	Nº Pac.	Esquema Terapêutico	Tempo (dias)
01	INH+RMP	120	26	INH+RMP+PZA	60
02	INH+RMP	75	27	INH+RMP	45
03	INH+RMP	180	28	INH+RMP+PZA	45
04	INH+RMP+PZA	60	29	INH+RMP+PZA	60
05	INH+RMP	75	30	INH+RMP+PZA	45
06	INH+RMP	90	31	INH+RMP	180
07	INH+RMP+PZA	60	32	INH+RMP+PZA	60
08	INH+RMP	90	33	INH+RMP	75
09	INH+RMP	90	34	INH+RMP	75
10	INH+RMP+PZA	60	35	INH+RMP	120
11	INH+RMP+PZA	60	36	INH+RMP+PZA	60
12	INH+RMP	135	37	INH+RMP	75
13	INH+RMP	165	38	INH+RMP	75
14	INH+RMP	120	39	INH+RMP	90
15	INH+RMP+PZA	60	40	INH+RMP	120
16	INH+RMP+PZA	60	41	INH+RMP+PZA	60
17	INH+RMP	90	42	INH+RMP	120
18	INH+RMP	120	43	INH+RMP	165
19	INH+RMP	90	44	INH+RMP+PZA	45
20	INH+RMP+PZA	60	45	INH+RMP+PZA	45
21	INH+RMP	90	46	INH+RMP	120
22	INH+RMP	120	47	INH+RMP+PZA	60
23	INH+RMP	90	48	INH+RMP	75
24	INH+RMP	120	49	INH+RMP	135
25	INH+RMP+PZA	60	50	INH+RMP+PZA	45

INH = isoniazida; RMP = rifampicina; PZA = pirazinamida

Quadro 13 – Dosagens dos fármacos indicadas para todas as formas de tratamento de tuberculose pulmonar e extrapulmonar (BRASIL, FUNDAÇÃO NACIONAL DA SAÚDE¹⁴, 2002)

Fase do tratamento	Fármaco	Peso do indivíduo			
		Até 20 Kg	20 Kg a 35 Kg	35 Kg a 45 Kg	Mais de 45 Kg
		mg/Kg/dia	mg/Kg/dia	mg/Kg/dia	mg/Kg/dia
1ª fase	Rifampicina	10	300	450	600
	Isoniazida	10	200	300	400
	Pirazinamida	35	1000	1500	2000
2ª fase	Rifampicina	10	300	450	600
	Isoniazida	10	200	300	400

No momento da coleta das amostras, 19 indivíduos (38%) se encontravam na primeira fase do tratamento no momento da coleta, sendo submetidos à associação de rifampicina, isoniazida e pirazinamida e 31 indivíduos (62%) estavam na segunda fase do tratamento, na qual utiliza-se a associação de rifampicina e isoniazida.

Os cinqüenta indivíduos do grupo tuberculose incluídos no estudo estavam sendo submetidos ao esquema terapêutico por no mínimo 45 dias e no máximo cento e oitenta dias, com média de 87,9 dias e desvio padrão de 36,6. Os 19 indivíduos na primeira fase de tratamento (INH+RMP+PZA) estavam sendo submetidos ao esquema terapêutico por no mínimo 45 e no máximo sessenta dias, com média de 56,05 dias e desvio padrão de 6,78. Os indivíduos que se encontravam na segunda fase (INH+RMP) no momento da coleta, estavam sendo medicados por um tempo mínimo de 75 e máximo cento e oitenta dias, com média de 107,41 dias e desvio padrão de 33,56.

5.2 Gênero *Candida*

Dentre os indivíduos incluídos no estudo, 62% foram positivos para *Candida* spp. na cavidade bucal, e 38% foram negativos. No grupo tuberculose observou-se maior porcentagem de indivíduos positivos para *Candida* spp. (72%) quando comparada com o grupo controle (52%). A tabela 1 representa a distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Candida* spp. na cavidade bucal em ambos os grupos. Ao analisar a presença de leveduras do gênero *Candida* no sulco gengival, verificou-se maior prevalência de indivíduos negativos tanto no grupo tuberculose quanto no grupo controle (62% e 90%, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 1 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Candida* spp. na cavidade bucal nos grupos tuberculose e controle

<i>Candida</i> spp.	Tuberculose (%)	Controle (%)	Total
Positivo	36 (72%)	26 (52%)	62 (62%)
Negativo	14 (28%)	24 (48%)	38 (38%)
Total	50 (100%)	50 (100%)	100 (100%)

Tabela 2 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Candida* spp. no sulco gengival nos grupos tuberculose e controle

<i>Candida</i> spp.	Tuberculose (%)	Controle (%)	Total
Positivo	19 (38%)	5 (10%)	24 (24%)
Negativo	31 (62%)	45 (90%)	76 (76%)
Total	50 (100%)	50 (100%)	100 (100%)

As medidas de centralização e dispersão dos valores obtidos de UFC/mL para presença de *Candida* spp. nos grupos tuberculose e controle e coeficiente de variação estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Estatística descritiva dos grupos tuberculose (TB) e controle (C) para presença de *Candida* spp. (UFC/mL) na cavidade bucal e sulco gengival

Região da coleta	Grupo	Média	D.P.	Coef. variação	Mediana	Amplitude
Cavidade Bucal	TB	4112,8	7049	171,4	600	31580
	C	1457,6	5279	362,2	20	35120
Sulco Gengival	TB	424,2	1416	333,8	0	8993
	C	5,01	19,53	389,7	0	100,2

D.P.: Desvio padrão

TB: tuberculose; C: controle

Espécies de *Candida* foram detectadas em número significativamente maior na cavidade bucal (média log UFC/mL = 3,61) e no sulco gengival (média log UFC/mL = 2,62) de indivíduos com tuberculose pulmonar em relação aos controles ($p=0,0085$ e $p=0,0103$). Esses dados estão representados na Tabela 4.

Tabela 4 – Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para comparação entre os valores médios obtidos de UFC por mL para *Candida* spp. nos grupos tuberculose (TB) e controle (C)

Região da coleta	Grupo	Média	Log 10	Valor p
Cavidade bucal	TB	4112,8	3,61	0,0085*
	C	1457,6	3,16	
Sulco gengival	TB	424,2	2,62	0,0103*
	C	5,01	0,69	

TB: tuberculose; C: controle

* diferença estatisticamente significativa

No grupo de indivíduos com tuberculose foram isoladas 181 amostras de leveduras do gênero *Candida*. *C. albicans* foi a espécie mais prevalente no grupo tuberculose, correspondendo a 60,8% dos isolados, seguida de *C. tropicalis* (24,3%). A distribuição percentual das espécies observadas no grupo tuberculose está representada na Tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição percentual de espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de indivíduos do grupo tuberculose

Espécie	Número de amostras	Porcentagem
<i>C. albicans</i>	110	60,8
<i>C. tropicalis</i>	44	24,3
<i>C. parapsilosis</i>	8	4,4
<i>C. stellatoidea</i>	4	2,2
<i>C. lipolytica</i>	4	2,2
<i>C. krusei</i>	3	1,7
<i>C. kefyr</i>	3	1,7
<i>C. glabrata</i>	3	1,7
<i>C. famata</i>	1	0,5
<i>C. guilliermondii</i>	1	0,5
Total	181	100

No grupo controle foram isoladas 119 amostras de leveduras do gênero *Candida*, sendo que a espécie mais prevalente foi *C. albicans* (89,9%). Os valores percentuais das espécies isoladas do grupo controle estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 – Distribuição percentual de espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de indivíduos do grupo controle

Espécie	Número de amostras	Porcentagem
<i>C. albicans</i>	107	89,9
<i>C. tropicalis</i>	12	10,1
Total	109	100

Foi possível observar a ocorrência de uma maior diversidade de espécies de *Candida* isoladas dos indivíduos do grupo tuberculose em relação aos controles, representada na figura 16.

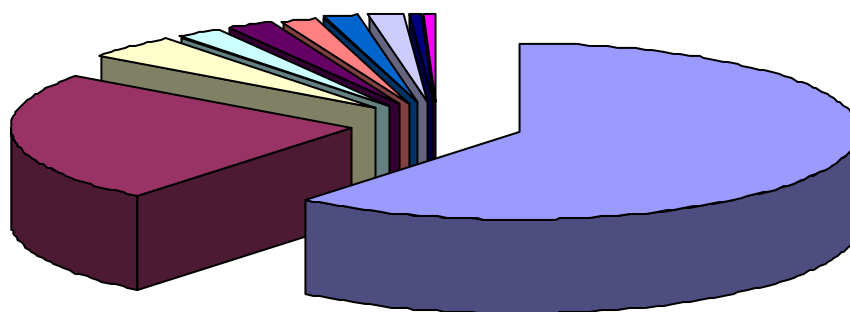
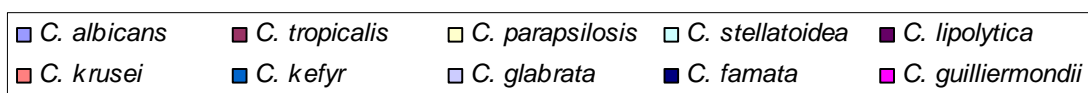
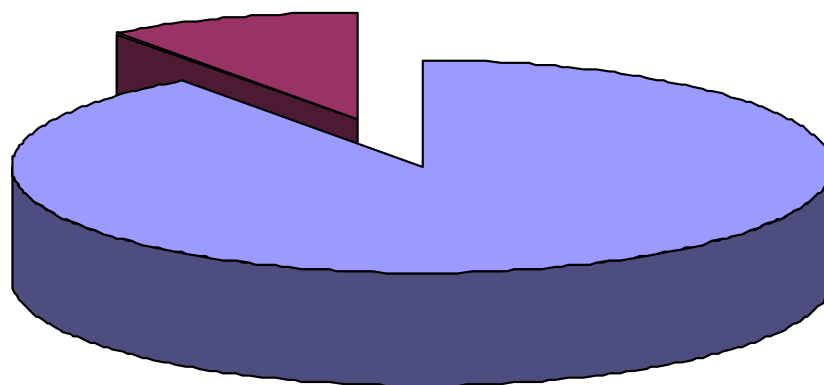
(A) Grupo Tuberculose**(B) Grupo Controle**

FIGURA 13 – Espécies de leveduras do gênero *Candida* isoladas da cavidade bucal de indivíduos dos grupos tuberculose (A) e controle (B)

5.3 Gênero *Staphylococcus*

Observou-se que 94% dos indivíduos incluídos no estudo foram positivos para *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal, sendo 96% dos indivíduos do grupo tuberculose e 92% dos indivíduos do grupo controle. No sulco gengival *Staphylococcus* spp. foi mais prevalente nos indivíduos do grupo controle (44%) em relação aos indivíduos do grupo tuberculose (38%). As Tabelas 7 e 8 representam a distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal e no sulco gengival, respectivamente, em ambos os grupos.

Tabela 7 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal nos grupos tuberculose e controle

<i>Staphylococcus</i> spp.	Tuberculose (%)	Controle (%)	Total
Positivo	48 (96%)	46 (92%)	94 (94%)
Negativo	2 (4%)	4 (8%)	6 (6%)
Total	50 (100%)	50 (100%)	100 (100%)

Tabela 8 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para *Staphylococcus* spp. no sulco gengival nos grupos tuberculose e controle

<i>Staphylococcus</i> spp.	Tuberculose (%)	Controle (%)	Total
Positivo	19 (38%)	22 (44%)	41 (41%)
Negativo	31 (62%)	28 (56%)	59 (59%)
Total	50 (100%)	50 (100%)	100 (100%)

As medidas de centralização e dispersão dos valores obtidos de UFC/mL para presença de *Staphylococcus* spp. nos grupos tuberculose e controle e coeficiente de variação estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Estatística descritiva dos grupos tuberculose (TB) e controle (C) para presença de *Staphylococcus* spp. (UFC/mL) na cavidade bucal e sulco gengival

Região da coleta	Grupo	Média	D.P.	Coef. variação	Mediana	Amplitude
Cavidade Bucal	TB	2698	4362	161,6	850	18820
	C	2782,8	3290	118,2	1380	13320
Sulco Gengival	TB	247,8	1199	483,9	0	7214
	C	16,36	33,95	207,4	0	158,6

D.P.: Desvio padrão

TB: tuberculose; C: controle

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tuberculose e controle para a presença de *Staphylococcus* spp. na cavidade bucal ($p=0,3664$) e no sulco gengival ($p=0,5404$), sendo que os valores médios obtidos de UFC por mL em ambos os grupos estão representados na Tabela 10.

Tabela 10 – Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para comparação entre os valores médios obtidos de UFC por mL para *Staphylococcus* spp. nos grupos tuberculose (TB) e controle (C)

Região da coleta	Grupo	Média	Log 10	Valor p
Cavidade bucal	TB	2698	3,43	0,3664
	C	2782,8	3,44	
Sulco gengival	TB	247,8	2,39	0,5404
	C	16,36	1,21	

TB: tuberculose; C: controle

Foram isoladas 465 amostras de *Staphylococcus* spp., sendo 209 (44,9%) do grupo tuberculose e 256 (55,1%) do grupo controle. Do total de amostras isoladas, 191 (41,1%) foram coagulase-positivas e 274 (58,9%) coagulase-negativas.

Após a verificação dos resultados das provas bioquímicas de produção de ácido a partir da D-trealose e Voges-Proskauer as cepas de *Staphylococcus* coagulase-positivas foram identificadas conforme representado na Figura 17.

Estafilococos coagulase-positivas

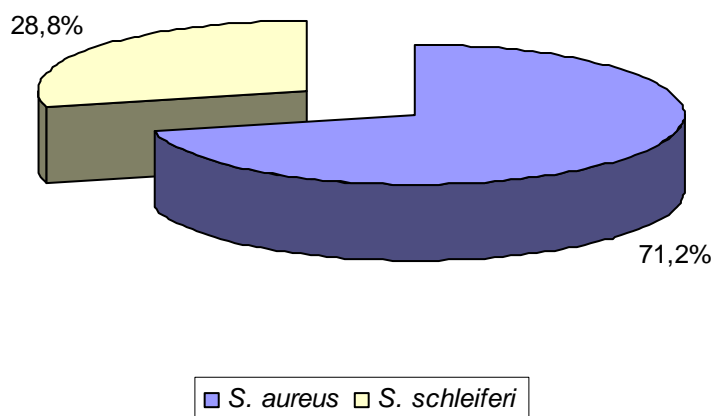


FIGURA 17 – Distribuição percentual de espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivas isoladas da cavidade bucal de indivíduos dos grupos tuberculose e controle

S. aureus foi a espécie mais prevalente nos grupos tuberculose (87,1%) e controle (63,6%). A figura 18 representa a distribuição percentual de espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivas nos grupos tuberculose e controle.

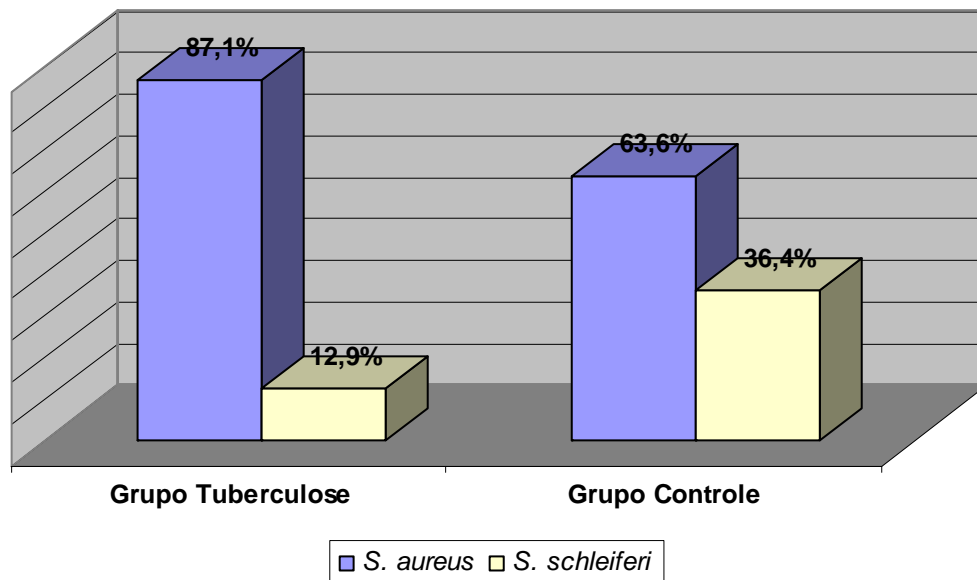


FIGURA 18 – Distribuição percentual de espécies de estafilococos coagulase-positivos encontradas na cavidade bucal de indivíduos dos grupos tuberculose (n=62) e controle (n=129)

As 274 amostras coagulase-negativas isoladas dos grupos tuberculose e controle foram identificadas utilizando-se o sistema API Staph (*Bio-Merieux*, França). No grupo de indivíduos com tuberculose foram isoladas 147 amostras de estafilococos coagulase-negativas, e no grupo controle, 127 amostras. *S. epidermidis* foi a espécie mais prevalente tanto no grupo de indivíduos com tuberculose (40,8%) como no grupo controle (63%). A distribuição percentual das espécies identificadas nos grupos tuberculose e controle estão representadas na tabela abaixo.

Tabela 11 – Distribuição percentual de espécies de estafilococos coagulase-negativas observadas nos grupos tuberculose (n=147) e controle (n=127)

Espécie	Grupo TB	Grupo C	Grupo Total
	Nº amostras (%)	Nº amostras (%)	Nº amostras (%)
<i>S. epidermidis</i>	60 (40,8)	80 (63)	140 (51,2)
<i>S. warneri</i>	16 (10,9%)	4 (3,1%)	20 (7,3%)
<i>S. capitis</i>	14 (9,5%)	6 (4,7%)	20 (7,3%)
<i>S. haemolyticus</i>	12 (8,2%)	6 (4,7%)	18 (6,6%)
<i>S. xylosus</i>	11 (7,4%)	6 (4,7%)	17 (6,2%)
<i>S. lugdunensis</i>	3 (2,1%)	10 (7,9%)	13 (4,7%)
<i>S. saprophyticus</i>	8 (5,4%)	2 (1,6%)	10 (3,6%)
<i>S. sciuri</i>	3 (2,1%)	7 (5,6%)	10 (3,6%)
<i>S. hominis</i>	4 (2,7%)	4 (3,1%)	8 (2,9%)
<i>S. lentus</i>	4 (2,7%)	2 (1,6%)	6 (2,2%)
<i>S. simulans</i>	4 (2,7%)	0	4 (1,5%)
<i>S. cohnii ureal</i>	4 (2,7%)	0	4 (1,5%)
<i>S. auricularis</i>	3 (2,1%)	0	3 (1,1%)
<i>S. chromogenes</i>	1 (0,7%)	0	1 (0,4%)
Total	147(100%)	127(100%)	274 (100%)

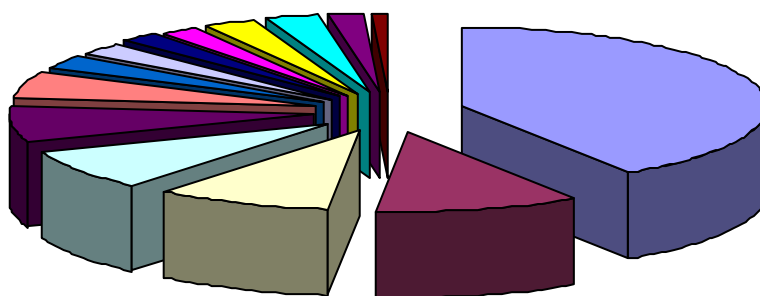
TB: tuberculose; C: controle

Com relação ao número total de amostras, incluindo estafilococos coagulase positivas e negativas, para ambos os grupos, *S. epidermidis* foi a espécie mais prevalente no grupo tuberculose (28,70%), seguida de *S. aureus* (25,83%). No grupo controle verificou-se maior prevalência de *S. aureus* (32,03%), seguida de *S. epidermidis* (24,60%).

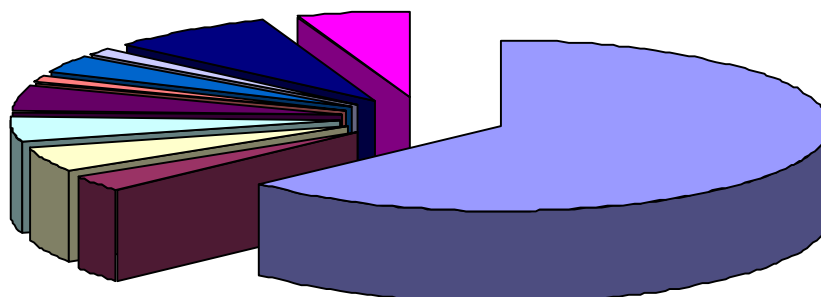
O grupo tuberculose apresentou maior diversidade de espécies em relação ao grupo controle. *S. simulans* (2,7%), *S. cohnii ureal*

(2,7%), *S. auricularis* (2,1%) e *S. chromogenes* (0,7%) foram isoladas somente do grupo tuberculose. As espécies de estafilococos coagulase-negativas identificadas nos grupos tuberculose e controle estão representadas na Figura 16.

(A) Grupo Tuberculose



(B) Grupo Controle



■ <i>S. epidermidis</i>	■ <i>S. warneri</i>	■ <i>S. capitis</i>	■ <i>S. haemolyticus</i>	■ <i>S. xylosus</i>
■ <i>S. saprophyticus</i>	■ <i>S. hominis</i>	■ <i>S. lentus</i>	■ <i>S. lugdunensis</i>	■ <i>S. sciuri</i>
■ <i>S. simulans</i>	■ <i>S. cohnii ureal</i>	■ <i>S. auricularis</i>	■ <i>S. chromogenes</i>	

FIGURA 16 – Espécies de estafilococos coagulase-negativas isoladas da cavidade bucal de indivíduos do grupo tuberculose (A) e controle (B)

5.4 Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae

A presença de Enterobactérias e *Pseudomonas* na cavidade bucal ocorreu em 56% dos indivíduos do grupo tuberculose e em 48% dos indivíduos do grupo controle. No sulco gengival esses microrganismos foram isolados de 18% dos indivíduos com tuberculose e 10% dos indivíduos controle. Esses dados estão expressos nas Tabelas 12 e 13.

Tabela 12 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para Enterobactérias e *Pseudomonas* na cavidade bucal nos grupos tuberculose e controle

Enterobactérias/ <i>Pseudomonas</i>	Tuberculose (%)	Controle (%)	Total
Positivo	28 (56%)	24 (48%)	52 (52%)
Negativo	22 (44%)	26 (52%)	48 (48%)
Total	50 (100%)	50 (100%)	100 (100%)

Tabela 13 – Distribuição percentual de indivíduos positivos e negativos para Enterobactérias e *Pseudomonas* no sulco gengival nos grupos tuberculose e controle

Enterobactérias/ <i>Pseudomonas</i>	Tuberculose (%)	Controle (%)	Total
Positivo	9 (18%)	5 (10%)	14 (14%)
Negativo	41 (82%)	45 (90%)	86 (86%)
Total	50 (100%)	50 (100%)	100 (100%)

As medidas de centralização e dispersão dos valores obtidos de UFC/mL para presença de Enterobactérias e *Pseudomonas* nos grupos tuberculose e controle e coeficiente de variação estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 – Estatística descritiva dos grupos tuberculose (TB) e controle (C) para presença de Enterobactérias e *Pseudomonas* (UFC/mL) na cavidade bucal e sulco gengival

Região da coleta	Grupo	Média	D.P.	Coef. variação	Mediana	Amplitude
Cavidade Bucal	TB	931,2	1716	184,2	40	7220
	C	812,4	2591	318,9	0	12900
Sulco Gengival	TB	118,4	755	637,7	0	5344
	C	17,8	68,3	382,4	0	334

D.P.: Desvio padrão

TB: tuberculose; C: controle

Com relação a presença de Enterobactérias e *Pseudomonas* não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os valores médios obtidos de UFC por mL na cavidade bucal ($p=0,1648$) e no sulco gengival ($p=0,2879$) no grupo de indivíduos com tuberculose e no grupo controle (Tabela 15).

Tabela 15 – Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$) para comparação entre os valores médios obtidos de UFC por mL para Enterobactérias e *Pseudomonas* nos grupos tuberculose (TB) e controle (C)

Região da coleta	Grupo	Média	Log 10	Valor p
Cavidade bucal	TB	931,2	2,96	0,1648
	C	812,4	2,90	
Sulco gengival	TB	118,4	2,07	0,2879
	C	17,8	1,25	

TB: tuberculose; C: controle

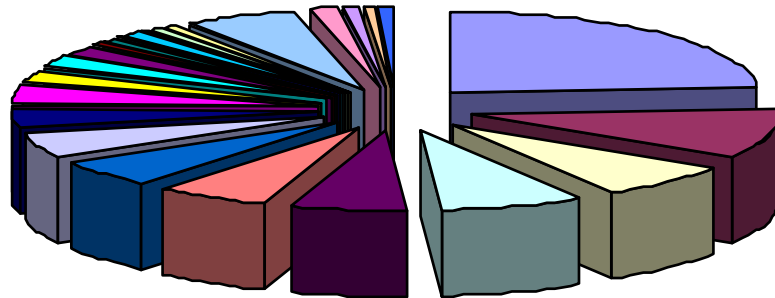
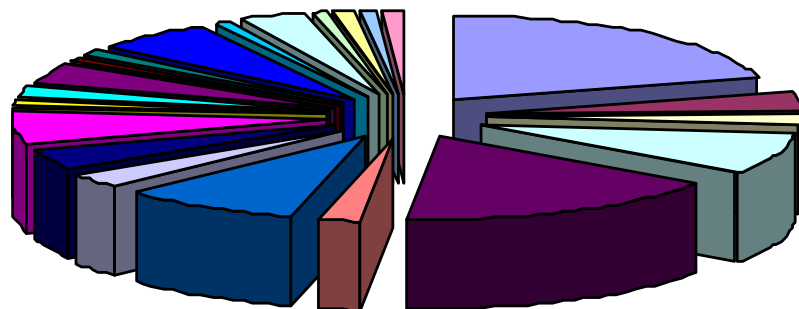
Foram isoladas 244 amostras de Enterobacteriaceae e bactérias do gênero *Pseudomonas*, sendo 147 (60,3%) do grupo tuberculose e 97 (39,7%) do grupo controle. Essas amostras foram identificadas utilizando-se o sistema API 20E (*Bio-Merieux*, França). A distribuição percentual das espécies isoladas dos grupos tuberculose e controle estão representadas na Tabela 16.

Tabela 16 – Distribuição percentual de espécies de enterobactérias e *Pseudomonas* observadas nos grupos tuberculose e controle

Espécie	Grupo Tuberculose	Grupo Controle	Grupo Total
<i>Enterobacter cloacae</i>	35 (23,8%)	20 (20,7%)	55 (22,6%)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9 (6,1%)	16 (16,6%)	25 (10,3%)
<i>Chryseomonas luteola</i>	15 (10,2%)	4 (4,1%)	19 (7,8%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11 (7,5%)	8 (8,2%)	19 (7,8%)
<i>Enterobacter sakazakii</i>	8 (7,5%)	9 (9,3%)	17 (7%)
<i>Serratia liquefaciens</i>	11 (7,5%)	2 (2,1%)	13 (5,4%)
<i>Escherichia coli</i>	9 (6,1%)	2 (2,1%)	11 (4,5%)
<i>Citrobacter freundii</i>	5 (3,4%)	6 (6,2%)	11 (4,5%)
<i>Serratia ficaria</i>	7 (4,7%)	3 (3,1%)	10 (4,1%)
<i>Enterobacter asburiae</i>	6 (4,1%)	4 (4,1%)	10 (4,1%)
<i>Serratia marcescens</i>	9 (6,1%)	0	9 (3,7%)
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	3 (2%)	4 (4,1%)	7 (2,9%)
<i>Pantoea</i> spp.	1 (0,7%)	6 (6,2%)	7 (2,9%)
<i>Serratia odorifera</i>	4 (2,7%)	1 (1%)	5 (2%)
<i>Kluyvera</i> spp.	3 (2%)	2 (2,1%)	5 (2%)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1 (0,7%)	3 (3,1%)	4 (1,6%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (0,7%)	1 (1%)	2 (0,8%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2 (1,4%)	0	2 (0,8%)
<i>Burkholderia cepacia</i>	1 (0,7%)	1 (1%)	2 (0,8%)
<i>Citrobacter koseri</i>	1 (0,7%)	1 (1%)	2 (0,8%)
<i>Salmonella</i> spp.	1 (0,7%)	1 (1%)	2 (0,8%)
<i>Klebsiella terrigena</i>	1 (0,7%)	1 (1%)	2 (0,8%)
<i>Morganella morganii</i>	1 (0,7%)	0	1 (0,4%)
<i>Serratia plymuthica</i>	1 (0,7%)	0	1 (0,4%)
<i>Serratia fonticola</i>	1 (0,7%)	0	1 (0,4%)
<i>Shigella</i> spp.	0	1 (1%)	1 (0,4%)
<i>Enterobacter amnigenus</i>	0	1 (1%)	1 (0,4%)
Total	147 (100%)	97 (100%)	244 (100%)

E. cloacae foi a espécie mais prevalente tanto no grupo tuberculose (23,8%) quanto no grupo controle (20,7%). As espécies mais prevalentes no grupo tuberculose após *E. cloacae* foram *Chryseomonas luteola* (10,2%), *Klebsiella pneumoniae* e *Serratia liquefaciens* que corresponderam a 7,5% dos isolados. No grupo controle *Klebsiella oxytoca* (16,6%) e *Enterobacter sakazakii* (9,3%) foram as espécies mais isoladas após *E. cloacae*.

Houve pequena prevalência de microrganismos do gênero *Pseudomonas* tanto na cavidade bucal de indivíduos do grupo tuberculose como do grupo controle, sendo isoladas as espécies *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*. Foram isoladas duas amostras de *P. aeruginosa* (0,8%), sendo uma no grupo tuberculose e uma no grupo controle. Observou-se a presença de *P. fluorescens* somente no grupo tuberculose (0,8%). A distribuição gráfica das espécies de enterobactérias e *Pseudomonas* identificadas nos grupos tuberculose e controle estão representadas na Figura 20.

(A) Grupo Tuberculose**(B) Grupo Controle**

<i>E. cloacae</i>	<i>C. luteola</i>	<i>S. liquefaciens</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>
<i>E. coli</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>S. ficaria</i>	<i>E. asburiae</i>	<i>C. freundii</i>
<i>S. odorifera</i>	<i>Kluyveraspp.</i>	<i>K. ornithinolytica</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>C. koseri</i>
<i>Pantoea spp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. aerogenes</i>	<i>Salmonella spp.</i>	<i>K. terrigena</i>
<i>S. marcescens</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>M. morgani</i>	<i>S. plymuthica</i>	<i>S. fonticola</i>
<i>Shigella spp.</i>	<i>E. aminigenus</i>			

FIGURA 17 – Espécies de Enterobactérias e *Pseudomonas* isoladas da cavidade bucal de indivíduos do grupo tuberculose (A) e controle (B)

6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve o objetivo de avaliar se a terapia antibiótica utilizada no tratamento de indivíduos com tuberculose pulmonar pode favorecer a colonização da cavidade bucal por microrganismos potencialmente oportunistas como leveduras do gênero *Candida*, *Staphylococcus* spp., bacilos entéricos e *Pseudomonas*.

6.1 População estudada

A tuberculose continua sendo importante problema de saúde pública, especialmente em países em desenvolvimento, como o Brasil. Apesar dos progressos registrados e da eficácia da estratégia de controle de tuberculose adotada, o Brasil ainda apresenta elevada incidência de casos notificados da doença, com aproximadamente cem mil casos novos anualmente. Em todas as unidades federativas existem municípios, especialmente em áreas metropolitanas e periféricas das grandes cidades, em que são registradas taxas altíssimas de incidência de tuberculose. O estado de São Paulo tem apresentado redução no número de casos novos de tuberculose registrados, entretanto a taxa de incidência ainda é considerada elevada. No ano de 2005 foram registrados mais de 16 mil casos novos, considerando-se todas as formas clínicas de tuberculose, sendo a taxa de incidência de tuberculose pulmonar superior a 8 mil casos novos neste ano (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO²², 2005).

M. tuberculosis e outras micobactérias patogênicas apresentam crescimento lento e tem a capacidade de se instalar no

interior de macrófagos, células reticulo-endoteliais e células gigantes. A localização intracelular e a resistência antimicrobiana são características que dificultam a quimioterapia e favorecem a persistência de microrganismos. Em virtude disso, o tratamento da tuberculose pulmonar consiste na administração de múltiplos agentes antimicrobianos por um período mínimo de seis a nove meses.

Os indivíduos com tuberculose pulmonar incluídos no presente estudo estavam sendo submetidos ao mesmo esquema terapêutico. Esse esquema consistia, numa primeira fase, de uma associação de isoniazida, rifampicina e pirazinamida durante dois meses, seguida por uma segunda fase, de quatro meses com isoniazida e rifampicina, por um período mínimo de 45 dias e máximo de seis meses. É importante ressaltar que os 31 indivíduos que estavam na segunda fase do tratamento (INH+RMP), já haviam sido submetidos à terapia com pirazinamida na primeira fase.

Com relação às condições de saúde bucal da população estudada, observou-se elevada incidência de patologias periodontais, caracterizadas pela presença de sangramento gengival e perda de inserção clínica, e elevado número de elementos dentários ausentes, sendo que em 85% dos casos houve necessidade de encaminhamento dos indivíduos para tratamento odontológico.

Os antimicrobianos constituem o principal fator de alteração da microbiota normal do organismo, provocando sua substituição por microrganismos resistentes aos fármacos em uso, os quais proliferam e podem provocar quadros patológicos recorrentes denominados superinfecção (VAN WINKELHOFF et al.¹⁷⁰, 1996). Os microrganismos que mais freqüentemente estão implicados no desenvolvimento de superinfecções são *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, enterobactérias e *Candida* spp. (ÁLVAREZ et al.⁵, 2005).

Leveduras do gênero *Candida* são considerados fungos comensais comumente isolados da cavidade bucal, trato gastrointestinal e mucosa vaginal, onde residem em equilíbrio com a microbiota local e com o sistema imune do hospedeiro. A defesa imunológica contra esses microrganismos deve-se a mecanismos inespecíficos, como integridade das mucosas e atividade de leucócitos e macrófagos, e mecanismos específicos, incluindo produção de anticorpos e imunidade mediada por células. Entretanto, *Candida* spp. possuem fatores de virulência capazes de produzir infecções em indivíduos com alterações da resposta imunológica em decorrência de infecção por HIV, neutropenia, distúrbios endócrinos e utilização prolongada de fármacos imunossupressores, corticosteróides e antibióticos.

Estafilococos possuem numerosos fatores de virulência e estão envolvidos em diversas doenças sistêmicas potencialmente fatais, incluindo pneumonia, septicemia e endocardite, e infecções oportunistas.

Enterobactérias produzem uma variedade de doenças humanas, incluindo casos de septicemia, infecções urinárias e infecções intestinais. Algumas espécies de *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia pestis* estão sempre associadas à doença em seres humanos, enquanto outras como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* são membros da microbiota humana que podem causar infecções oportunistas. *Pseudomonas* são microrganismos ubíquos, possuem capacidade de crescimento em praticamente qualquer ambiente, apresentam numerosos fatores estruturais e toxinas que aumentam sua virulência e ampla resistência antimicrobiana. Apesar disso, não são patógenos comuns sendo as infecções por *Pseudomonas* basicamente oportunistas.

Enterobactérias e *Pseudomonas* são freqüentemente descritos como patógenos em infecções nosocomiais e infecções agudas, entretanto não são usualmente estudados na cavidade bucal humana. Quando presentes, geralmente encontram-se em pequeno número e são

considerados como parte da microbiota transitória. Diversos fatores podem resultar em alterações na microbiota bucal, e especialmente em indivíduos imunossuprimidos esses microrganismos podem ocorrer em números elevados. Em virtude da possibilidade da administração sistêmica de antimicrobianos promover aumento de estafilococos, enterobactérias e *Pseudomonas* e dos importantes fatores de virulência apresentados por estes microrganismos em uma grande variedade de infecções humanas, pareceu plausível avaliar sua ocorrência na cavidade bucal de indivíduos com tuberculose pulmonar.

6.2 Gênero *Candida*

Infecções por leveduras do gênero *Candida* representam atualmente um problema significativo especialmente entre indivíduos imunossuprimidos. No presente estudo observou-se que, no grupo de indivíduos diagnosticados com tuberculose pulmonar e que estavam sendo submetidos a antibioticoterapia, a porcentagem de indivíduos positivos para leveduras do gênero *Candida* foi de 72%. Esse resultado mostrou-se inferior em relação ao obtido por Ribeiro¹³⁵ (2003), onde foi observada prevalência de 88% de leveduras do gênero *Candida* em indivíduos receptores de transplante cardíaco ortotópico e que não apresentavam evidência clínica de candidose bucal. A prevalência de *Candida* spp. relatada por Belazi et al.¹⁰ (2005) na cavidade bucal de indivíduos com diabetes *mellitus* tipo II foi de 64%, inferior aos resultados do presente estudo. Por outro lado, os resultados do presente estudo mostraram-se semelhantes aos observados por Figueiredo et al.⁴² (2001), que relataram a ocorrência de *Candida* spp. em 70,97% dos indivíduos HIV-positivos analisados.

A ocorrência de *Candida* spp. pode ser observada na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, uma vez que são considerados fungos comensais. Observou-se neste estudo a ocorrência de *Candida*

spp. em 52% dos indivíduos saudáveis incluídos no grupo controle, sendo que esses resultados estão em concordância com os obtidos por Ribeiro¹³⁵ (2003), de 56%. Maior prevalência de *Candida* na saliva de indivíduos com fatores predisponentes, entre eles, presença de próteses, aparelhos ortodônticos, doença periodontal e respiradores bucais (73,8%) foram demonstrados no estudo de Jorge et al.⁷² (1997). Nesse trabalho observou-se ainda uma prevalência inferior (38,42%) de indivíduos positivos para *Candida* em relação à referida no presente estudo. Martins et al.⁹⁷ (2002) também relataram maior prevalência de *Candida* spp. na cavidade de indivíduos saudáveis, de 61,76%, em relação ao presente estudo. Entretanto, Belazi et al.¹⁰ (2005) observaram uma menor prevalência de leveduras do gênero *Candida* em indivíduos sistemicamente saudáveis (40%).

Essas diferenças na prevalência de *Candida* spp. podem estar relacionadas com o método de coleta das amostras empregado. No presente estudo as amostras da cavidade bucal foram coletadas pela técnica de enxágüe bucal, enquanto que no estudo de Jorge et al.⁷² (1997) foram coletadas amostras de saliva e Belazi et al.¹⁰ (2005) obtiveram amostras da cavidade bucal com a utilização de *swabs*.

Sabe-se que o uso prolongado de antibióticos pode estar relacionado com alterações da microbiota bucal normal e possível aumento na ocorrência de microrganismos oportunistas como leveduras do gênero *Candida*. Foi possível observar, no presente estudo, que espécies de *Candida* foram detectadas em número significativamente maior na cavidade bucal e no sulco gengival de indivíduos com tuberculose em relação aos controles.

Quanto às espécies encontradas, *C. albicans* foi a mais freqüentemente isolada em ambos os grupos, seguida por *C. tropicalis*. *C. albicans* foi isolada de 60,8% dos indivíduos do grupo tuberculose, o que está de acordo com diversos estudos os quais relataram que *C. albicans* é a espécie predominante na cavidade bucal, constituindo 60 a 70% do total

de isolamento, seguida por *C. tropicalis* (STENDERUP¹⁶⁵, 1990; JORGE et al.⁷², 1997; GRIMOUD et al.⁵², 2003; RIBEIRO¹³⁵, 2003; MARTINS et al.⁹⁸, 2002; ZÖLLNER & JORGE¹⁸⁷, 2003). A presença de *C. glabrata*, no entanto, não seguiu a predominância esperada após *C. albicans* e *C. tropicalis*, como relatada pelos mesmos autores. Neste estudo, *C. parapsilosis* foi a espécie mais prevalente após *C. tropicalis*, sendo isolada de 4,4% dos indivíduos com tuberculose pulmonar. Por outro lado, *C. glabrata* foi observada numa frequência de 1,7%, inferior à relatada em vários estudos de 7 a 24% (CANNON et al.¹⁹, 1995; JORGE et al.⁷², 1997; FIGUEIREDO et al.⁴², 2001; GRIMOUD et al.⁵², 2003; ZÖLLNER & JORGE¹⁸⁷, 2003). Considerou-se no presente estudo *C. dubliniensis* e *C. albicans* como um grupo, em virtude da semelhança fenotípica entre estas espécies, não tendo sido realizada a identificação molecular de *C. dubliniensis*.

Observou-se também neste estudo, maior diversidade de espécies de *Candida* no grupo de indivíduos com tuberculose pulmonar. Neste grupo, além de amostras de *C. albicans* e *C. tropicalis*, foram isolados também *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. lipolytica*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. glabrata*, *C. famata* e *C. guilliermondi*, enquanto no grupo controle foram isoladas somente *C. albicans* e *C. tropicalis*. Esses resultados estão em concordância com estudos prévios que relataram uma prevalência mais elevada de espécies não-*albicans* em indivíduos com fatores predisponentes (JORGE et al.⁷², 1997; KOMIYAMA et al.⁸³, 2004).

6.3 Gênero *Staphylococcus*

No presente estudo, foi observada elevada prevalência de *Staphylococcus* spp. em ambos os grupos (96% no grupo tuberculose e 92% no grupo controle). Esses resultados foram superiores aos relatados por Pannutti et al.¹²¹ (2001) de 13,3% no biofilme supragengival de

indivíduos portadores de paralisia cerebral institucionalizados, e por Loberto et al.⁹³ (2004) de 61,36% na cavidade bucal de indivíduos diagnosticados com periodontite crônica. Entretanto, nossos resultados concordam com os descritos por Martins et al.⁹⁷ (2002), que observaram a presença de *Staphylococcus* spp. em 95,6% dos indivíduos avaliados. Considera-se que as fossas nasais constituem o local de maior frequência de isolamento de *Staphylococcus* spp. (KONEMAN et al.⁸⁵, 2001; UENO & JORGE¹⁶⁹, 2006). As elevadas prevalências deste microrganismo na cavidade bucal humana sugerem que esta pode constituir um reservatório de estafilococos tão importante quanto as fossas nasais.

Estafilococos tem sido isolados tanto de sítios subgingivais de indivíduos diagnosticados com doença periodontal quanto de sítios periodontalmente saudáveis, sendo que Murdoch et al.¹¹¹ (2004) relataram que a presença destes microrganismos variou de 29% a 54%. Nossos resultados concordam com esses dados, pois foram isolados *Staphylococcus* spp. do sulco gengival de 38% dos indivíduos com tuberculose e de 44% dos indivíduos controle. A análise estatística não demonstrou diferenças significativas entre os grupos tuberculose e controle para os valores médios obtidos de UFC por mL de *Staphylococcus* na cavidade bucal e no sulco gengival.

Do total de amostras isoladas de *Staphylococcus* spp. neste estudo, 58,9% eram coagulase-negativas e 41,1% foram coagulase-positivas, o que difere dos resultados obtidos por Pannutti et al.¹²¹ (2001), que relataram que todas as amostras (100%) de estafilococos isoladas de indivíduos com deficiência mental institucionalizados foram identificadas como coagulase-positivas. Martins et al.⁹⁷ (2002) apresentaram resultados semelhantes aos descritos no presente estudo, sendo que 63% das amostras obtidas da cavidade bucal dos indivíduos analisados foram coagulase-negativas. Apesar de estafilococos coagulase-negativas terem sido considerados por muitos anos como tendo pequena importância clínica, atualmente sabe-se que

estes microrganismos estão associados importantes patologias humanas como infecções urinárias, endocardite, infecções de válvulas cardíacas, osteomielites e infecções nosocomiais. A incidência de bacteriemias causadas por estafilococos coagulase-negativas tem aumentado significativamente, sendo que aproximadamente metade dos óbitos associados a bacteriemias são causados por espécies de estafilococos coagulase-negativas (DARINI et al.³⁴, 1994; PATTI et al.¹²², 1994; ÖHMAN et al.¹¹⁸, 1995; KONEMAN et al.⁸⁵, 2001; PENÃFIEL et al.¹²³, 2003; CHANG et al.²⁴, 2004; MEMMEL et al.¹⁰², 2004).

No presente estudo *S. epidermidis* foi a espécie mais prevalente no grupo tuberculose, correspondendo a 28,70% do total de isolados. Loberto et al.⁹³ (2004) também relataram maior prevalência de *S. epidermidis* na cavidade bucal de indivíduos com doença periodontal, sendo a prevalência relatada por estes autores semelhante (27,27%) a encontrada no presente estudo. No grupo controle observou-se maior frequência de *S. aureus* (32,03%), seguida de *S. epidermidis* (24,60%).

S. aureus foi a segunda espécie mais prevalente após *S. epidermidis* nos indivíduos com tuberculose pulmonar. No presente estudo, essa espécie correspondeu a 11,6% dos isolados no grupo tuberculose. Esses resultados foram inferiores aos observados no estudo realizado por Loberto et al.⁹³ (2004), no qual *S. aureus* representou 25% das amostras isoladas, utilizando método similar à descrita no presente estudo para a coleta das amostras. Prevalência semelhante de *S. aureus* na cavidade bucal foi relatada por Martins et al.⁹⁷ (2002), sendo este microrganismo identificado em 13,9% das amostras de enxágüe bucal. Contrariamente, Belazi et al.¹⁰ (2005) relataram uma prevalência elevada de *S. aureus* (52,4%) na mucosa bucal de indivíduos portadores de próteses dentárias. As elevadas prevalências de espécies patogênicas de estafilococos enfatizam a importância da cavidade bucal como reservatório significativo desses microrganismos, podendo resultar na disseminação para outras regiões do organismo, especialmente em indivíduos imunossuprimidos,

assim como na transmissão destes para outros indivíduos, alimentos e objetos.

Algumas espécies de estafilococos isoladas no presente estudo de ambos os grupos não são consideradas como parte da microbiota bucal. *S. warneri* e *S. capitis* foram isolados da cavidade bucal tanto do grupo de indivíduos com tuberculose pulmonar (10,9% e 9,5%, respectivamente) como no grupo de indivíduos controle (3,1% e 4,7%, respectivamente). Entretanto, a presença dessas espécies na cavidade bucal também foi relatada no estudo de Loberto et al.⁹³ (2004), sendo que *S. warneri* foi identificado em 6% e *S. capitis* em 12,12% das amostras.

6.4 Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae

As bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae são exaustivamente estudadas pela área médica, sendo conhecida sua patogenicidade no organismo humano, porém, na cavidade bucal estas bactérias não eram consideradas patogênicas (PETERSON et al.¹²⁶, 1990; SLOTS et al.¹⁵³, 1990; SLOTS et al.¹⁵⁶, 1991).

A prevalência de Enterobacteriaceae e bactérias do gênero *Pseudomonas* encontrada neste estudo foi elevada tanto na cavidade bucal dos indivíduos com tuberculose pulmonar (56%) como nos indivíduos do grupo controle (48%). Esses resultados foram semelhantes aos observados por Santos & Jorge¹⁴⁵ (1998), que também relataram prevalência bastante elevada (51%) de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal de indivíduos brasileiros em amostragem heterogênea e aleatória. A alta prevalência de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal pode representar um reservatório destes microrganismos, o que poderia comprometer gravemente a vida de indivíduos debilitados ou imunossuprimidos.

Por outro lado, Pannutti et al.¹²¹ (2001) obtiveram em seu estudo, menor prevalência de Enterobacteriaceae e bactérias do gênero *Pseudomonas*, tendo sido verificada a presença desses microrganismos no biofilme supragengival de 33% dos indivíduos analisados.

Santos et al.¹⁴⁶ (2002), em trabalho utilizando a mesma metodologia, observaram menor ocorrência de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal de indivíduos com periodontite crônica (43,18%) quando comparado com o presente estudo.

Os resultados deste trabalho demonstraram prevalência de Enterobacteriaceae e bactérias do gênero *Pseudomonas* no sulco gengival de 18% nos indivíduos do grupo tuberculose e de 10% nos indivíduos do grupo controle. Slots et al.¹⁵⁵ (1988) relataram prevalência de bacilos entéricos e pseudomonas (10,2%) na microbiota subgengival de indivíduos com doença periodontal semelhante à observada no grupo controle do presente estudo utilizando o mesmo sistema de identificação (API 20E). O estudo realizado por Slots et al.¹⁵³ (1990) em indivíduos com doença periodontal relataram ocorrência semelhante destes microrganismos (14%) à observada por Santos et al.¹⁴⁶ (2002) na microbiota subgengival dos indivíduos avaliados (15,9%). Nossos resultados demonstraram prevalência pouco superior no grupo tuberculose, mas inferior no grupo controle aos observados por estes autores. Entretanto, no presente trabalho, a amostragem foi aleatória com relação à condição periodontal, sendo a população estudada bastante heterogênea.

Ainda não está esclarecido o papel patogênico de bacilos entéricos e pseudomonas na microbiota subgengival. Entretanto nos estudos de Slots et al.¹⁵⁵ (1988) e Slots et al.¹⁵⁴ (1990) os indivíduos avaliados haviam sido tratados com antibióticos sistêmicos de amplo espectro, por não apresentarem resposta satisfatória aos procedimentos periodontais convencionais. Sendo assim, os autores sugerem que a presença de enterobactérias e pseudomonas em números elevados na

microbiota subgengival pode ser resultado da antibioticoterapia prévia utilizada, e que estes grupos de microrganismos podem atuar como cofatores na destruição dos tecidos periodontais.

De acordo com nossos resultados, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios obtidos de UFC por mL para Enterobacteriaceae e bactérias do gênero *Pseudomonas* na cavidade bucal e sulco gengival de indivíduos submetidos a antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar e grupo controle.

No presente estudo foram isoladas 244 amostras de Enterobacteriaceae e bactérias do gênero *Pseudomonas*, sendo 147 (60,3%) do grupo tuberculose e 97 (39,7%) do grupo controle. *E. cloacae* foi a espécie mais prevalente tanto no grupo tuberculose (23,8%) quanto no grupo controle (20,7%), resultados também encontrados por Santos & Jorge¹⁴⁵ (1998) e Santos et al.¹⁴⁶ (2002) em prevalências mais elevadas (31% e 43,75%, respectivamente).

Klebsiella oxytoca foi a segunda espécie mais freqüentemente isolada da cavidade bucal dos indivíduos do grupo controle neste estudo, numa freqüência de 16,6%. No estudo de Santos & Jorge¹⁴⁵ (1998) foi observada maior prevalência de outra espécie de *Klebsiella*, após *E. cloacae*, que foi *Klebsiella pneumoniae*, correspondendo a 18,3% do total de isolamento, seguida então de *K. oxytoca* (14,1%). Nossos resultados demonstraram uma menor prevalência de *K. pneumoniae* tanto no grupo tuberculose quanto no grupo controle em relação ao estudo de Santos & Jorge¹⁴⁵ (1998), sendo este microrganismo isolado de 7,5% e 8,2% das amostras, respectivamente. Entretanto, *K. oxytoca* também foi a espécie mais prevalente (12,5%) após *E. cloacae* no estudo de Santos et al.¹⁴⁶ em 2002.

Contrariamente, no grupo de indivíduos com tuberculose pulmonar observou-se maior prevalência de *Chryseomonas luteola*

(10,2%), após *E. cloacae*, resultado que difere do estudo de Santos e Jorge¹⁴⁵ (1998) que não relatou a ocorrência desta espécie na cavidade bucal dos indivíduos analisados, e também do estudo de Santos et al.¹⁴⁶ (2002), no qual esta espécie foi isolada em baixa frequência (2,08%).

Pseudomonas foram encontradas em baixa prevalência no presente estudo, sendo isoladas as espécies *Pseudomona aeruginosa* (0,8%) e *Pseudomonas fluorescens* (0,8%). *P. aeruginosa* foi isolada tanto no grupo tuberculose (0,7%) como no grupo controle (1%), sendo este microrganismo de importância médica significativa devido à sua resistência a antibióticos e desinfetantes (AGARWAL et al.², 2005; VITKAUSKIENE et al.¹⁷³, 2005; MATHUR et al.¹⁰⁰, 2005). Esta espécie de *Pseudomonas* foi relatada como a mais isolada da família Pseudomonadaceae nos estudos de Santos & Jorge¹⁴⁵ (1998) e Santos et al.¹⁴⁶ (2002). *P. fluorescens* foi isolada somente da cavidade bucal de indivíduos com tuberculose pulmonar (1,4%), sendo esta prevalência igual à observada no estudo de Santos & Jorge¹⁴⁵ (1998). Por outro lado, *P. fluorescens* não foi encontrada na cavidade bucal de indivíduos com doença periodontal, realizado por Santos et al.¹⁴⁶ (2002).

A elevada prevalência de Enterobacteriaceae na cavidade bucal tanto de indivíduos com tuberculose pulmonar quanto de indivíduos sistemicamente saudáveis verificada no presente estudo e em concordância com estudos prévios (SANTOS & JORGE¹⁴⁵, 1998; SANTOS et al.¹⁴⁶, 2002) podem levantar a hipótese de que a incidência destes microrganismos na cavidade bucal possa estar relacionada a números elevados de coliformes na água de abastecimento e nos alimentos, observada nos países subdesenvolvidos.

Esta elevada prevalência é bastante importante, visto que a cavidade bucal pode representar um reservatório destes microrganismos, com capacidade de produzir uma grande variedade de enzimas e toxinas, envolvidos em infecções humanas severas. Desta

forma, a presença destes microrganismos pode acarretar sérios comprometimentos à vida de indivíduos debilitados e imunossuprimidos.

Candida spp., *Staphylococcus* spp., bactérias das famílias Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae tem sido descritos cada vez mais como patógenos oportunistas potenciais, envolvidos em processos de superinfecções, podendo ser encontrados em elevadas prevalências na cavidade bucal humana. Neste contexto, mais estudos sobre a virulência, patogenicidade e correlação com outros microrganismos são de grande importância.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, concluímos que:

- a) a quantidade de leveduras do gênero *Candida* foi detectada em número significativamente maior na cavidade bucal e no sulco gengival de indivíduos com tuberculose pulmonar em relação aos controles;
- b) *Candida albicans* foi a espécie mais prevalente, seguida de *C. tropicalis*, em ambos os grupos. Observou-se a ocorrência de uma maior diversidade de espécies de *Candida* isoladas dos indivíduos do grupo tuberculose em relação aos controles;
- c) não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tuberculose e controle para a quantidade de *Staphylococcus* spp., Enterobactérias e *Pseudomonas* na cavidade bucal e no sulco gengival;
- d) *Staphylococcus epidermidis* foi a espécie mais prevalente no grupo tuberculose, seguida de *S. aureus*. No grupo controle observou-se uma frequência semelhante de *S. epidermidis* e *S. aureus*;
- e) *Enterobacter cloacae* foi a espécie mais prevalente de Enterobactérias tanto no grupo tuberculose quanto no grupo controle.
- f) Observou-se uma maior diversidade de espécies de *Staphylococcus* e Enterobactérias isoladas dos indivíduos do grupo tuberculose em relação aos controles.

8 REFERÊNCIAS*

- 1 ADDY, M.; MARTIN M.V. Systemic antimicrobials in the treatment of chronic periodontal diseases: a dilemma. **Oral Dis**, v.9, suppl.1, p.38-44, 2003.
- 2 AGARWAL, R. et al. Epidemiology, risk factors and outcome of nosocomial infections in a respiratory intensive care unit in North India. **J Infect**, v.9, Dec. 2005. Epub ahead of print.
- 3 AHMAD, S. et al. Isolation and molecular identification of *Candida dubliniensis* from non-human immunodeficiency virus-infected patients in Kuwait. **J Med Microbiol**, v.53, pt.7, p. 633-7, July 2004.
- 4 AL-ABEID, H.M. et al. Isolation and characterization of *Candida* spp. in jordanian cancer patients: prevalence, pathogenic determinants, and antifungal sensitivity. **Jpn J Infect Dis**, v.57, n.6, p.279-84, Dec. 2004.
- 5 ÁLVAREZ, C. et al. Riesgo de sobreinfección asociado con el uso de antibióticos. Todos los antibióticos son iguales? **Rev Esp Quimioterap**, v.18, n.1, p.39-44, Mar 2005.

* Baseado em:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Informação e documentação:** referências, elaboração, NBR 6023. Rio de Janeiro, 2002.23p.

- 6 AMERICAN ACADEMY OF PERIODONTOLOGY. **Ann Periodontol**, v.4, n.1, p.1-6, Dec. 1999.
- 7 ANTUNES, J.L.F.; WALDMAN, E.A. Tuberculosis in the twentieth century: time-series mortality in São Paulo, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v.15, n.3, p.463-76, jul./set. 1999.
- 8 BARBOSA, F.C.B. et al. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from brazilian periodontitis patients. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, n.5, p.306-10, Oct. 2001.
- 9 BASSETTI, M. et al. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. **BMC Infect Dis**, v.10, n.6, p.21-6, Feb. 2006.
- 10 BELAZI, M. et al. Candidal overgrowth in diabetic patients: potential predisposing factors. **Mycoses**, v.48, n.3, p.192-6, May 2005.
- 11 BENDEL, C.M.; HOSTETTER, M.K. Distinct mechanisms of epithelial adhesion for *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. Identification of the participating ligands and development of inhibitory peptides. **J Clin Invest**, v.92, n.4, p.1840-9, Oct. 1993.
- 12 BERGHMANS, T.; SCULIER, J.P.; KLASTERSKY, J. A prospective study of infectious in lung cancer patients admitted to the hospital. **Chest**, v.124, n.1, p.114-20, 2003.
- 13 BRANGER, S. et al. *Escherichia coli* endocarditis: seven new cases in adults and review of the literature. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.24, n.8, p.537-41, Aug. 2005.

- 14 BRASIL. Ministério Da Saúde. Fundação Nacional da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 5.ed. Brasília: FUNASA, 2002.
- 15 BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde lança campanha de massa contra tuberculose. Disponível em: <http://www.portal.saude.gov.br>. Acesso em: 20 Nov. 2004.
- 16 BROOK, I. Secondary bacterial infections complicating skin lesions. **J Med Microbiol**, v.51, n.10, p.808-12, Oct. 2002.
- 17 BURTS, M.L. et al. EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. **PNAS**, v.102, n.4, p.1169-74, Jan. 2005.
- 18 CAIAZZA, N.C.; O'TOOLE, G.A. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. **J Bacteriol**, v.185, n.10, p.3214-7, May 2003.
- 19 CANNON, R.D. et al. Oral *Candida*: clearance, colonization, or candidiasis? **J Dent Res**, v.74, n.5, p.1152-61, May 1995.
- 20 CAPOLUONGO, E. et al. Heterogeneity of oral isolates of *Candida albicans* in HIV positive patients: correlation between candidal carriage, karyotype and disease stage. **J Med Microbiol**, v.49, n.11, p.985-91, Nov. 2000.
- 21 CAPOOR, M.R. et al. Emergence of non-albicans *Candida* species and antifungal resistance in tertiary care hospital. **Jpn J Infect Dis**, v.58, n.6, p.344-8, Dec. 2005.

- 22 CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DO ESTADO DE SÃO PAULO. Casos novos de tuberculose por forma clínica e faixa etária. São Paulo: CVE, 2005. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/tuberculose>. Acesso em: 31 Mar. 2006.
- 23 CHAIMOWICZ, F. Age transition of tuberculosis incidence and mortality in Brazil. **Rev Saúde Pública**, v.35, n.1, p.81-7, Fev. 2001.
- 24 CHANG, C.F. et al. Infective endocarditis in maintenance hemodialysis patients: fifteen years' experience in one medical center. **J Nephrol**, v.17, n.2, p.228-35, Apr. 2004.
- 25 CHAVASCO, J.K. et al. Molecular identification of *Candida dubliniensis* isolated from oral lesions of HIV-positive and HIV-negative patients in São Paulo, Brazil. **Rev Inst Med Trop S Paulo**, v.48, n.1, p.21-6, Jan./Feb. 2006.
- 26 COLE, S.T. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. **Nature**, v.393, n.6685, p.537-44, June 1998.
- 27 COLEMAN, D.C. et al. Candidiasis: the emergence of a novel species, *Candida dubliniensis*. **AIDS**, v.11, n.5, p.557-67, Apr. 1997.
- 28 COLL, P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.21, n.6, p.299-308, 2003.

- 29 CORKER, H.; POOLE, R.K. Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. **J Biol Chem**, v.278, n.34, p.31581-92, Aug. 2003.
- 30 CRACK, J.; GREN, J. THOMSON, A.J. Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). **J Biol Chem**, v.279, n.10, p.9278-86, Mar. 2004.
- 31 DAGDEVIREN, M.; CERIKCIOGLU, N.; KARAVUS, M. Acid proteinase, phospholipase and adherence properties of *Candida parapsilosis* strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients. **Mycoses**, v.48, n.5, p.321-6, Sept. 2005.
- 32 DAHLÉN, G.; WIKSTRÖM, M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. **Oral Microbiol Immunol**, v.10, n.1, p.42-6, Feb. 1995.
- 33 DALLE, F. et al. β -1,2 and α -1,2 linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. **Infect Immun**, v.71, n.12, p.7061-8, Dec. 2003.
- 34 DARINI, A.L.C. et al. Study of multiresistant *Staphylococcus aureus* isolates from a brazilian hospital. **Rev Microbiol**, v.25, n.4, p.225-8, 1994.
- 35 DARVEAU, R. P.; TANNER, A.; PAGE, R. C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol 2000**, v.14, p.12-32, June 1997.
- 36 DARWAZEH, A.M.G.; AL-DOSARI, A.; AL-BAGIEH, N.H. Oral *Candida* and nasal *Aspergillus* flora in a group of Saudi healthy dentate subjects. **Int Dent J**, v.52, n.4, p.273-7, 2002.

- 37 DAVID, H. L. Basis for lack of drug susceptibility of atypical mycobacteria. **J Infect Dis**, v.3, n.5, p.878-84, Sept./Oct. 1981.
- 38 DYE, C.; WATT, C.J.; BLEED, D. Low access to a highly effective therapy: a challenge for international tuberculosis control. **Bull World Health Org**, v.80, n.6, p.437-44, 2002.
- 39 DYE, C. et al. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country. **J Am Med Assoc**, v.282, n.7, p.677-86, Aug. 1999.
- 40 ENDIMIANI, A. et al. *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.7, p.2598-605, July 2005.
- 41 ENOCH, D.A.; SIMPSON, A.J.H.; KIBBLER, C.C. Predictive value of isolating *Pseudomonas aeruginosa* from aerobic and anaerobic blood culture bottles. **J Med Microbiol**, v.53, pt.11. p.1151-4, Nov. 2004.
- 42 FIGUEIREDO, R.L.Q. et al. Estudo microbiológico da prevalência de enterobactérias na cavidade bucal de pacientes HIV positivos e sua relação com o gênero *Candida*. **J Bras Clin Est Odontol**, v.5, n.26, p.111-5, mar./abr. 2001.
- 43 FILLIUS, P.M.G. et al. Comparative evaluation of three chromogenic agars for detection and rapid identification of aerobic Gram-negative bacteria in the normal intestinal microflora. **Clin Microbiol Infect**, v.9, n.9, p.912-8, Sept. 2003.

- 44 FLYNN, M.J.; SLOTS, J. Beta-hemolytic streptococci in advanced periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v.8, n.5, p.295-7, Oct. 1993.
- 45 FORBES, B.A.; SAHM, D.F.; WEISSFELD, A.S. **Diagnostic microbiology**. 10.ed. St. Louis: Mosby, 1998.
- 46 FUHRER, T.; FISCHER, E.; SAUER, U. Experimental identification and quantification of glucose metabolism in seven bacterial species. **J Bacteriol**, v.187, n.5, p.1581-90, Mar. 2005.
- 47 GIACOMETTI, A. et al. Epidemiology and microbiology of surgical wound infections. **J Clin Microbiol**, v.38, n.2, p.918-22, Feb. 2000.
- 48 GILFILLAN, G.D. et al. *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. **Microbiology**, v.144 (Pt. 4), p.829-38, Apr. 1998.
- 49 GOKARN, R.R.; EITEMAN, M.A.; ALTMAN, E. Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of the carboxylase and pyruvate carboxylase. **Appl Environ Microbiol**, v.66, n.5, p.1844-50, May 2000.
- 50 GOLEMI-KOTRA, D. et al. Resistance to β -lactam antibiotics and its mediation by the sensor domain of the transmembrane BlaR signaling pathway in *Staphylococcus aureus*. **J Biol Chem**, v.278, n.20, p.18419-25, May 2003.
- 51 GREENSPAN, D. Treatment of oral candidiasis in HIV infection. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.78, n.2, p.211-5, Aug. 1994.

- 52 GRIMOUD, A.M. et al. Colonization of the oral cavity by *Candida* species: risk factors in long-term geriatric care. **J Oral Sci**, v.45, n.1, p.51-5, Mar. 2003.
- 53 GROSS, T.J.; CHRISTENSEN, P.J. Sepsis and neurologic deficit after lung transplantation. **Chest**, v.118, n.3, p.849-51, Sept. 2000.
- 54 HA, U.; JIN, S. Expression of the *soxR* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is inducible during infection of burn wounds in mice and is required to cause efficient bacteremia. **Infect Immunol**, v.67, n.10, p.5324-31, Oct. 1999.
- 55 HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v.5, p.78-111, June 1994.
- 56 HANDAL, T. et al. β -lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v.19, n.5, p.303-8, Oct. 2004.
- 57 HANNULA, J. et al. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, n.2, p.113-8, Apr. 2001.
- 58 HASENCLEVER, H.F.; MITCHELL, W.O. Antigenic studies of *Candida*. I. Observation of two antigenic groups in *Candida albicans*. **J Bacteriol**, v.82, p.570-3, Oct. 1961.

- 59 HAZEN, K.C. Participation of yeast cell surface hydrophobicity in adherence of *Candida albicans* to human epithelial cells. **Infect Immunol**, v.57, n.7, p.1894-900, July 1989.
- 60 HAZEN, K.C. et al. Partial biochemical characterization of cell surface hydrophobicity and hydrophilicity of *Candida albicans*. **Infect Immunol**, v.58, n.11, p.3469-76, Nov. 1990.
- 61 HAZEN, K.C. et al. Differential adherence of hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. **Infect Immunol**, v.59, n.3, p.907-12, Mar. 1991.
- 62 HEBERT, G.A.; HANCOCK, G.A. Synergistic hemolysis exhibited by species of Staphylococci. **J Clin Microbiol**, v.22, n.3, p.409-15, Sept. 1985.
- 63 HELOVUO, H.; HAKKARAINEN, K.; PAUNIO, K. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. **Oral Microbiol Immunol**, v.8, n.2, p.75-9, Apr. 1993.
- 64 HEWLETT, D.; HORN, D. L.; ALFALLA, C. Drug resistant tuberculosis: inconsistent results of pyrazinamide susceptibility testing. **J Am Med Assoc**, v.273, n.12, p.916-7, Mar. 1995.
- 65 HIJJAR, M.A. Tuberculose: desafio permanente. **Cad Saúde Pública**, v.21, n.2, p.348, Mar.-Abr. 2005. (Editorial).
- 66 HOLMSTRUP, P.; AXÉLL, T. Classification and clinical manifestations of oral yeast infections. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.57-9, Feb. 1990.

- 67 HOLT, J.G. et al. Facultatively anaerobic Gram-negative rods. In: _____. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. p.175-89.
- 68 HOPEWELL, P. C. Tuberculosis control: how the world has changed since 1990. **Bull World Health Org**, v.80, n.6, p.427, 2002.
- 69 HUBE, B.; NAGLIAK, J. *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. **Microbiol**, v.147 (Pt. 8), p.1997-2005, Aug. 2001.
- 70 JABRA-RIZK, M.A. et al. Prevalence of yeast among children in Nigeria and the United States. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, n.6, p.383-6, Dec. 2001.
- 71 JOB, J.R.P.P. et al. Informações que antecederam o diagnóstico de tuberculose pulmonar e tempo decorrido até o início do tratamento em pacientes matriculados em Centro de Saúde, São Paulo (Brasil). **Rev Saúde Públ**, v.20, n.1, p.21-5, fev. 1986.
- 72 JORGE, A.O.C. et al. Presença de leveduras do gênero *Candida* na saliva de pacientes com diferentes fatores predisponentes e de indivíduos controle. **Rev Odontol Univ São Paulo**, v.11, n.4, p.279-85, out./dez. 1997.
- 73 KAMMA, J.J.; NAKOU, M.; BAEHNI, P.C. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. **J Periodont Res**, v.34, n.1, p.25-33, Jan. 1999.

- 74 KANDA, M. et al. Detection and rapid increase of salivary antibodies to *Staphylococcus lentus*, an indigenus bacterium in rabbit saliva, through a single tonsillar application on bacterial cells. **Oral Microbiol Immunol**, v.16, n.5, p.257-64, Oct. 2001.
- 75 KAYE, K. S. et al. Variety of β -lactamases produced by amoxicillin-clavulanate-resistant *Escherichia coli* isolated in the Northeastern United States. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.5, p.1520-5, May 2004.
- 76 KIM, S.W. et al. *Pseudomonas aeruginosa* as a potential cause of antibiotic-associated diarrhea. **J Korean Med Sci**, v.16, n.6, p.742-4, Dec. 2001.
- 77 KIMURA, L.H.; PEARSALL, N.N. Adherence of *Candida albicans* to human buccal epithelial cells. **Infect Immun**, v.21, n.1, p.64-8, July 1978.
- 78 KINANE, D.F.; LAPPIN, D.F. Clinical, pathological and immunological aspects of periodontal disease. **Acta Odontol Scan**, v.59, n.3, p.154-77, June 2001.
- 79 KIRISITS, M.J. et al. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Appl Environ Microbiol**, v.71, n.8, p.4809-21, Aug. 2005.
- 80 KLASTERSKY, J. Nosocomial infections due to Gram-negative bacilli in compromised hosts: considerations for prevention and therapy. **Rev Infect Dis**, v.7, suppl.4, p.552-8, Nov./Dec. 1985.

- 81 KLUYTMANS, J.; BELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms and associated risks. **Clin Microbiol Rev**, v.10, n.3, p.505-20, July 1997.
- 82 KOGA-ITO, C.Y.; MARTINS, C.A.P.; JORGE, A.O.C. Estudo do gênero *Candida*. In: JORGE, A.O.C. **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Ed. Santos, 2006. Cap.15. p.219-35.
- 83 KOMIYAMA, E.Y. et al. Prevalence of yeasts in the oral cavity of children treated with inhaled corticosteroids. **Braz Oral Res**, v.18, n.3, p.197-201, July/Sept. 2004.
- 84 KOMURO, I. et al. Human alveolar macrophages and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced monocyte-derived macrophages are resistant to H₂O₂ via their high basal and inducible levels of catalase activity. **J Biol Chem**, v.276, n.26, p.24360-4, June 2001.
- 85 KONEMAN, E.W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Trad. A.E. Cury. 5.ed. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 2001. 1465p.
- 86 KONNO, K.; NAGAYAMA, H.; OKA, S. Nicotinamidase in mycobacteria: method for distinguishing bovine type tubercle bacilli from other mycobacteria. **Nature**, v.184, Suppl.22, p.1743-4, Nov. 1959.

- 87 KRETSCHMAR, M. et al. Germ tubes and proteinase activity contribute to virulence of *Candida albicans* in murine peritonitis. **Infect Immunol**, v.67, n.12, p.6637-42, Dec. 1999.
- 88 KUMAR, C.P.G; KUMAR, S.S.J.; MENON, T. Phospholipase and proteinase activities of clinical isolates of *Candida* from immunocompromised patients. **Mycopathol**, v.161, n.4, p.213-8, Apr. 2006.
- 89 LAFORCE, F.M. et al. Human oral defenses against Gram-negative rods. **Am Rev Resp Dis**, v.114, p.929-35, 1976.
- 90 LAUPLAND K.B. et al. Invasive *Candida* species infections: a 5 year population-based assessment. **J Antimicrob Chemother**, v.56, n.3, p.532-7, Sept. 2005.
- 91 LEE, J. W.; LOEVINSOHN, E.; KUMARESAN, J.A. Response to a major disease of poverty: the global partnership to stop TB. **Bull World Health Org**, v.80, n.6, p.428, 2002.
- 92 LYELL, A. Alexander Ogton, micrococci and Joseph Lister. **J Amer Acad Dermatol**, v.20, n.2, p.302-10, Feb. 1989.
- 93 LOBERTO, J.C.S. et al. *Staphylococcus* spp. In the oral cavity and periodontal pockets of chronic periodontitis patients. **Braz J Microbiol**, v.35, p.64-8, 2004.
- 94 LOWELL, J.L. et al. Identifying sources of human exposure to plague. **J Clin Microbiol**, v.43, n.2, p.650-6, Feb. 2005.

- 95 MARQUES, A.M.C.; CUNHA, R.V. A medicação assistida e os índices de cura de tuberculose e de abandono de tratamento na população indígena Guarani-Kaiwá no município de Dourados, Mato-Grosso do Sul, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v.19, n.5, p.1405-11, set./out. 2003.
- 96 MARSOU, R. et al. Distribution of *Staphylococcus sciuri* subspecies among human clinical specimens, and profile of antibiotic resistance. **Res Microbiol**, v.150, n.8, p.531-44, Oct. 1999.
- 97 MARTINS, C.A.P.; KOGA-ITO, C.Y.; JORGE, A.O.C. Presence of *Staphylococcus* spp. and *Candida* spp. in the human oral cavity. **Braz J Microbiol**, v.33, p.236-40, 2002.
- 98 MARTINS, C.A.P. et al. Presença de *Candida* spp. em pacientes com periodontite crônica. **Cienc Odontol Bras**, v.5, n.3, p.75-83, set./dez. 2002.
- 99 MASUOKA, J.; HAZEN, K.C. Cell wall mannan and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* serotype A and B strains. **Infect Immun**, v.72, n.11, p.6230-6, Nov. 2004.
- 100 MATHUR, P.; KAPIL, A.; DAS, B. Nosocomial bacteraemia in intensive care unit patients of a tertiary care centre. **Indian J Med Res**, v.122, n.4, p.305-8, Oct. 2005.
- 101 McCULLOUGH, M.J.; ROSS, B.C.; READE, P.C. *Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. **J Oral Maxillofac Surg**, v.25, n.2 p.136-44, Apr. 1996.

- 102 MEMMEL, H.; KOWAL-VERN, A.; LATENSER, B.A. Infections in diabetic burn patients. **Diabetes Care**, v.27, n.1, p.229-33, Jan. 2004.
- 103 MIDDLEBROOK, G. Sterilization of tubercle bacilli by isonicotinic acid hydrazid and the incidence of variants resistant to the drug *in vitro*. **Am Rev Tuberc**, v.65, n.6, p.765-7, June 1952.
- 104 MOKADY, D.; GOPHNA, U.; RON, E. Extensive gene diversity in septicemic *Escherichia coli* strains. **J Clin Microbiol**, v.43, n.1, p.66-73, Jan. 2005.
- 105 MONROY, T.B. et al. *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans* colonization in patients wearing dental prothesis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.10 Suppl.1, p.E27-E39, Apr. 2005.
- 106 MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol 2000**, v.5, p.66-77, June 1994.
- 107 MORAN, G.J. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.6, p.928-30, June 2005.
- 108 MOREIRA, D. et al. *Candida* spp. biotypes in the oral cavity of school children from different socioeconomic categories in Piracicaba – SP, Brazil. **Pesqui Odontol Bras**, v.15, n.3, p.187-95, jul./set. 2001.

- 109 MOTA, F.F. et al. Distribuição espacial da mortalidade por tuberculose em Salvador, Bahia, Brasil. **Cad Saúde Pública**, v.19, n.4, p.915-22, jul./ago. 2003.
- 110 MOTTA, R.N. et al. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase-producing strains of Enterobacteriaceae isolated from diabetes foot infections in a Brazilian Diabetic Center. **Braz J Infect Dis**, v.7, n.2, p.129-34, Apr. 2003.
- 111 MURDOCH, F.E.; SAMMONS, R.L.; CHAPPLE, I.L.C. Isolation and characterization of subgingival staphylococci from periodontitis patients and controls. **Oral Dis**, v.10, n.3, p.155-62, Apr. 2004.
- 112 MURRAY, P.R. et al. Enterobacteriaceae. In: __. **Microbiologia médica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2000. Cap.29. p.193-203.
- 113 NATAL, S. A retomada da importância da tuberculose como prioridade para ações de saúde pública. **Bol Pneum Sanit**, v.6, n.2, p.40-1, jul./dez. 1998.
- 114 NAVEEN, R.; MATHAI, E. Some virulence characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* in different patient groups. **Indian J Med Res**, v.122, n.2, p.143-7, Aug. 2005.
- 115 NIYOGI, S.K. Shigellosis. **J Microbiol**, v.43, n.2, p.133-43, Apr. 2005.
- 116 OBERHOFER, T.R. Characteristics of human isolates of unidentified fluorescent pseudomonads capable of growth at 42°C. **J Clin Microbiol**, v.14, n.5, p.492-5, Nov. 1981.

- 117 OHKUSU, K. Cost-effective and rapid presumptive identification of Gram-negative bacilli in routine urine, pus, and stool cultures: evaluation of the use of CHROMagar orientation medium in conjunction with simple biochemical tests. **J Clin Microbiol**, v.38, n.12, p.4586-92, Dec. 2000.
- 118 ÖHMAN, S.C. et al. The prevalence of *Staphylococcus aureus*, Enterobacteriaceae species, and *Candida* species and their relation to oral mucosal lesions in a group of 79-year-olds in Göteborg. **Acta Odontol Scand**, v.53, n.1, p.49-54, Feb. 1995.
- 119 OLSEN, I. Oral adhesion of yeasts. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.46-53, Feb. 1990.
- 120 OPLUSTIL, C.P. et al. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2000.
- 121 PANUTTI, C.M. et al. Prevalência de microrganismos superinfectantes na placa bacteriana supragengival de deficientes mentais institucionalizados. **Rev Pos Grad Fac Odontol Univ São Paulo**, v.8, n.1, p.35-9, jan./mar. 2001.
- 122 PATTI, J.M. et al. The *Staphylococcus aureus* collagen adhesin is a virulence determinant in experimental septic arthritis. **Infect Immunol**, v.62, n.1, p.152-61, Jan. 1994.
- 123 PENÃFIEL, F.S. et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization in immunocompetent elderly patients: clinical features, prognostic factors and treatment. **Arch Bronconeumol**, v.39, n.8, p.333-40, Aug. 2003.

- 124 PÉREZ-SANCHÉZ, J. et al. Linfangioma abdominal infectado por *Salmonella enteritidis*. **Ann Pediatr**, v.63, n.3, p.263-72, Sept. 2005. (Carta).
- 125 PEROMINGO-MATUTE, E. et al. Recaída de meningitis por *Salmonella* tras tratamiento con cefotaxima. **Ann Pediatr**, v.63, n.4, p.375-6, Oct. 2005. (Carta).
- 126 PETERSON, D.E. et al. Effect of granulocytopenia on oral microbial relationships in patients with acute leukemia. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.70, n.6, p.720-3, Dec. 1990.
- 127 PITOUT, J.D.D. et al. β -lactamases and detection of β -lactam resistance in *Enterobacter* spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v.41, n.1, p.35-9, Jan. 1997.
- 128 PITOUT, J.D.D. et al. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. **J Antimicrob Chemother**, v.56, n.1, p.52-9, May 2005.
- 129 RAMAGE, G. et al. Characteristics of biofilm formation by *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol** v.18, n.4, p.163-170, Dec. 2001.
- 130 RAMIREZ-AMADOR, V. et al. Candidal colonization and oral candidiasis in patients undergoing oral and pharyngeal radiation therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.84, n.2, p.149-53, Aug. 1997.

- 131 RAMS, T.E.; SLOTS, J. *Candida* biotypes in human adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v.6, n.3, p.191-2, June 1991.
- 132 RAMS, T.E.; BABALOLA, O.O.; SLOTS, J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.3, p.166-8, June 1990.
- 133 RAMS, T.E.; FEIK, D.; SLOTS, J. Staphylococci in human periodontal diseases. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.1, p.29-32, Feb. 1990.
- 134 RAVIGLIONE, M.C.; SNIDER, D.E.; KOCHI, A. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity and mortality of a worldwide epidemic. **J Am Med Assoc**, v.273, n.3, p.220-6, Jan. 1996.
- 135 RIBEIRO, P.M. **Presença de leveduras do gênero *Candida* na cavidade bucal de receptores de transplante cardíaco**. 2003. 85f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal, Área de Concentração em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2003.
- 136 ROSSETTI, M.L.R. et al. Tuberculose resistente: revisão molecular. **Rev Saúde Pública**, v.36, n.4, p.525-32, Aug. 2002.
- 137 RUFFINO-NETTO, A. Tuberculose: a calamidade negligenciada. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, n.1, p.51-8, jan./fev. 2002.

- 138 RUIMY, R. et al. Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. **Infect Immunol**, v.69, n.1, p.584-8, Jan. 2001.
- 139 SAMARANAYAKE, L.P.; MACFARLANE, T.W. **Oral candidosis**. London: Wright, 1990. 265p.
- 140 SANDVÉN, P. Laboratory identification and sensitivity testing of yeast isolates. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.27-36, Feb. 1990.
- 141 SANTANA, M.A. et al. Prevalence of pathogens in cystic fibrosis patients in Bahia, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.7, n.1, p.69-72, Feb. 2003.
- 142 SANT'ANA, P.L. et al. Multicenter brazilian study of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.97, n.2, p.253-7, Mar. 2002.
- 143 SANTO, A.H.; PINHEIRO, C.E.; JORDANI, M.S. Causas básicas e associadas de morte por AIDS, Estado de São Paulo, Brasil, 1998. **Rev Saúde Pública**, v.34, n.6, p.581-8, Dec. 2000.
- 144 SANTO, A.H.; PINHEIRO, C.E.; JORDANI, M.S. Causas múltiplas de morte relacionadas à tuberculose no Estado de São Paulo, 1998. **Rev Saúde Pública**, v.37, n.6, p.714-21, Dec. 2003.
- 145 SANTOS, S.S.F.; JORGE, A.O.C. Presença de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal humana. **Rev Odontol UNESP**, v.27, n.2, p.473-84, jul./dez. 1998.

- 146 SANTOS, S.S.F. et al. Prevalência e sensibilidade *in vitro* de Enterobacteriaceae e *Pseudomonas* isoladas da cavidade bucal e bolsa periodontal de pacientes com periodontite crônica. **Pós-Grad Rev Odontol**, v.5, n.2, p.74-83, maio/ago. 2002.
- 147 SCHALLER, M. et al. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v.48, n.6, p.365-77, Nov. 2005.
- 148 SCORPIO, A. et al. Rapid differentiation of bovine and human tubercle bacilli based on a characteristic mutation in the bovine pyrazinamidase gene. **J Clin Microbiol**, v.35, n.1, p.106-10, Jan. 1997.
- 149 SECKO, D. Pathogens fight back. **CMAJ**, v.173, n.8, p.864, Oct. 2005.
- 150 SEGAL, E. et al. Adherence *in vitro* of various *Candida* species to acrylic surfaces. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.66, n.6, p.670-3, Dec. 1988.
- 151 SHAFER, R.W.; EDLIN, B.R. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. **Clin Infect Dis**, v.22, n.4, p.683-704, Apr. 1996.
- 152 SILVA, C.P.R. et al. *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a cancer unit of a general hospital predisposing factors and evaluation of the impact of intervention measures. **Braz J Infect Dis**, v.9, n.3, p.225-30, June 2005.

- 153 SLOTS, J.; FEIK, D.; RAMS, T.E. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.3, p.149-54, June 1990.
- 154 SLOTS, J.; FEIK, D.; RAMS, T.E. Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients. **Oral Microbiol Immunol**, v.5, n.6, p.305-8, Dec. 1990.
- 155 SLOTS, J.; RAMS, T.E.; LISTGARTEN, M.A. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**, v.3, n.2, p.47-52, June 1988.
- 156 SLOTS, J. et al. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. **J Periodontol**, v.62, n.9, p.543-7, Sept. 1991.
- 157 SMITH, R.S.; IGLEWSKI, B.H. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing as a potential antimicrobial target. **J Clin Invest**, v.112, n.10, p.1460-5, Nov. 2003.
- 158 SOCIEDADE BRASILEIRA DE PNEUMOLOGIA E TISIOLOGIA. Tuberculose. Disponível em: www.sbpt.org.br. Acesso em: 27 fev. 2004.
- 159 SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J Periodontol**, v.63, n.4, p.322-31, Apr. 1992.

- 160 SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. **Periodontol** **2000**, v.28, p.12-55, 2002.
- 161 SOGAARD, M.; STENDER, H.; SCHONHEYDER, H.C. Direct identification of major blood culture pathogens, including *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*, by a panel of fluorescence in situ hybridization assays using peptide nucleic acid probes. **J Clin Microbiol**, v.43, n.4, p.1947-9, Apr. 2005.
- 162 SOINI, H.; MUSSER, J.M. Molecular diagnosis of mycobacteria. **Clin Chem**, v.47, n.5, p.809-14, May 2001.
- 163 SOUZA, W.V. et al. Tuberculosis in Brazil: construction of a territorially based surveillance system. **Rev Saude Publica**, v.39, n.1, p.82-9, Feb. 2005.
- 164 SPOLIDORIO, D.M.P. et al. Avaliação quantitativa de *Streptococcus* do grupo *mutans* e *Candida* spp. e fatores salivares na cavidade bucal de pacientes submetidos à radioterapia. **Pesqui Odontol Bras**, v.15, n.4, p.354-8, out./dez. 2001.
- 165 STENDERUP, A. Oral Micology. **Acta Odontol Scand**, v.48, n.1, p.3-10, Apr. 1990.
- 166 SULLIVAN, D.J.; MORAN, G.P.; COLEMAN, D.C. *Candida dubliniensis*: ten years on. **FEMS Microbiol Lett**, v.253, n.1, p.9-17, Dec. 2005.
- 167 TSENG, Y. et al. Nosocomial bloodstream infection in a neonatal intensive care unit of a medical center: a three-year review. **J Microbiol Immunol Infect**, v.35, n.3, p.168-72, Sept. 2002.

- 168 UENO, M.; JORGE, A.O.C. Bacilos Gram-negativos. In: JORGE, A.O.C. **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Ed. Santos, 2006. Cap.6. p.65-84.
- 169 UENO, M.; JORGE, A.O.C. Cocos Gram-positivos. In: JORGE, A.O.C. **Princípios de microbiologia e imunologia**. São Paulo: Ed. Santos, 2006. Cap.9. p.115-41.
- 170 VAN WINKELHOFF, A.J.; RAMS, T.E.; SLOTS, J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. **Periodontol** **2000**, v.10, p.45-78, Feb. 1996.
- 171 VELGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: the problem related to *Salmonella enterica* serotype enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Vet Res** v.36, n.3, p.267-88, May/June 2005.
- 172 VIDOTTO, V. et al. Adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to buccal and vaginal cells. **Rev Iberoam Micol**, v.20, n.2, p.52-54, June 2003.
- 173 VITKAUSKIENE, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* strains from nosocomial pneumonia are more serum resistant than *P. aeruginosa* strains from noninfectious respiratory colonization processes. **Infection**, v.33, n.5/6, p.356-61, Oct. 2005.
- 174 WACHINO, J. et al. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.6, p.1960-7, June 2004.

- 175 WEBB, B.C. et al. *Candida*-associated denture stomatitis. A etiology and management: a review. Part 1. Factors influencing distribution of *Candida* species in the oral cavity. **Aust Dent J**, v.43, n.1, p.45-50, Feb. 1998.
- 176 WHITELEY, A.S. et al. Cytochemical colocalization and quantitation of phenotypic and genotypic characteristics in individual bacterial cells. **Appl Environ Microbiol**, v.62, n.6, p.1873-9, June 1996.
- 177 WILLIAMS, D.W.; LEWIS, M.A.O. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. **Oral Dis**, v.6, n.1, p.3-11, Jan. 2000.
- 178 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **What is DOTS?** A guide to understanding the WHO recommended TB control strategy known as DOTS. Geneva: WHO, 1999. Disponível em: <http://www.who.int/gtb/publications>. Acesso em: 13 fev. 2005.
- 179 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global tuberculosis control.** Surveillance, planning, financing. WHO Report 2002. Geneva: WHO, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/gtb/publications>. Acesso em: 13 fev. 2005.
- 180 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Treatment of tuberculosis: guidelines for national programmes. 3. ed. Geneva: WHO. 2003. Disponível em: <http://www.who.int/gtb/publications>. Acesso em: 20 nov. 2004.
- 181 YAMASAKI, O. et al. Clinical manifestations of staphylococcal scalded-skin syndrome depend on serotypes of exfoliative toxins. **J Clin Microbiol**, v.43, n.4, p.1890-3, Apr. 2005.

- 182 YANG, C.W. et al. Prevalence of *Candida* species, including *Candida dubliniensis*, in Singapore. **J Clin Microbiol**, v.41, n.1, p.472-4, Jan. 2003.
- 183 YANG, Y.L. Virulence factors of *Candida* species. **J Microbiol Immunol Infect**, v.36, n.4, p.223-8, Dec. 2003.
- 184 YARWOOD, J.M.; SCHLIEVERT, P.M. Quorum sensing in *Staphylococcus* infections. **J Clin Invest**, v.112, n.11, p.1620-5, Dec. 2003.
- 185 ZAID, T. et al. Growth of *Escherichia coli* in iron-enriched medium increases HPI catalase activity. **J Biochem Mol Biol**, v.36, n.6, p.608-10, Nov. 2003.
- 186 ZHANG, Y. et al. The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. **Nature**, v.385, n.6387, p.591-3, Aug. 1992.
- 187 ZÖLLNER, M.S.C.; JORGE, A.O.C. *Candida* spp. occurrence in oral cavities of breastfeeding infants and their mother's mouths and breasts. **Pesqui Odontol Bras**, v.17, n.2, p.151-5, abr./jun. 2003.

Anexo A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP.

Anexo B – Termo de informação e consentimento para a participação em pesquisa clínica.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título: Microrganismos superinfectantes na cavidade bucal de indivíduos submetidos a antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar.

Pesquisadores:

Silvia Maria Rodrigues Querido

Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos – UNESP

Introdução

As informações a seguir descreverão esta pesquisa e o papel que você terá como participante. Os pesquisadores responsáveis pelo estudo responderão a todas as perguntas que você possa ter sobre o estudo. Leia-o atentamente e não tenha dúvida em perguntar qualquer coisa sobre as informações abaixo.

Propósito

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa clínica cujo objetivo é determinar a presença de leveduras, estafilococos, enterobactérias e pseudomonas em sulco gengival/bolsa periodontal e cavidade bucal de indivíduos submetidos à terapia antibiótica prolongada, utilizado no tratamento de tuberculose e indivíduos controle.

Descrição

Serão incluídos no presente estudo indivíduos previamente diagnosticados com tuberculose no Ambulatório de Tisiologia

da Policlínica II do Departamento de Saúde da Prefeitura Municipal de Taubaté durante um ano, portadores ou não de doença periodontal e indivíduos sistemicamente saudáveis.

Custo e pagamento

Não haverá nenhum custo adicional para o voluntário. O material necessário para o desenvolvimento do estudo será de responsabilidade dos pesquisadores.

Sigilo

O indivíduo que concordar em participar deste estudo terá seus dados cadastrados em uma ficha que pertence aos participantes do grupo de pesquisa, que se comprometem em manter segredo sobre a identidade do voluntário e a não divulgá-la na publicação deste trabalho ou a outras pessoas.

Direito de se retirar da pesquisa

O voluntário pode recusar-se a participar deste estudo e a sua decisão não afetará negativamente o atendimento. Deve também estar ciente de que os pesquisadores podem pedir para que ele se retire do estudo. O indivíduo terá liberdade de desistir de participar em qualquer momento, sem nenhum prejuízo a ele e nenhuma punição.

Desconforto, riscos e benefícios esperados

As amostras serão coletadas através de bochechos e cones de papel absorvente, e o exame clínico ao qual o indivíduo será submetido não causa trauma, não acarreta dor ou qualquer risco ou custo ao indivíduo. Por outro lado, oferece elevada possibilidade de gerar conhecimento para a compreensão, diagnóstico e prevenção da infecção periodontal que afeta o bem-estar dos participantes desta pesquisa e de outros indivíduos.

Linguagem acessível e esclarecimentos

Todo voluntário deverá estar em condições de autonomia plena e boa saúde geral. Os esclarecimentos e informações fornecidos ao voluntário sobre a forma como o trabalho será realizado e seus objetivos serão feitos com uma linguagem clara e acessível.

Consentimento voluntário

O voluntário deve certificar-se de que leu o exposto acima, bem como que compreendeu o conteúdo. Uma cópia será entregue a ele e outra será arquivada junto aos documentos dos pesquisadores. A assinatura deste termo significa concordância em participar do estudo experimental.

Contato: Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

Disciplina de Microbiologia e Imunologia

Telefone: (12) 3947-9033

Eu, _____,
nascido (a) em ___/___/_____, na cidade de
_____, portador (a) do
RG _____ e CPF _____
residente na _____, nº _____, estado civil
_____ desejo participar da pesquisa sobre “Microrganismos
superinfectantes em cavidade bucal de indivíduos submetidos a
antibioticoterapia para tratamento de tuberculose pulmonar” e tenho pleno
conhecimento que o presente estudo tem como objetivo favorecer a
pesquisa, o diagnóstico e o tratamento. Concordo que fotografias,
históricos clínicos, resultados de exames clínicos constituem propriedade
da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos/UNESP, a qual
dou plenos direitos de retenção e uso para quaisquer fins de ensino,
pesquisa, divulgação em jornais e/ou revistas científicas. Declaro também
ter lido e entendido a carta de informação e consinto a minha participação
no estudo.

Assinatura – Data: ___/___/_____.

Apêndice A – Ficha de anamnese utilizada para os indivíduos do grupo Tuberculose.

Nº

Dados Pessoais

Nome: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Gênero: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Telefone: () _____

RG: _____ CPF: _____

História Médica

Forma clínica de tuberculose: () Pulmonar

() Extrapulmonar

Forma: _____

Início do Tratamento: ___/___/_____.

Esquema de Tratamento _____

Data de Coleta: ___/___/_____.

Tempo de tratamento no momento de coleta: _____

Tempo previsto de tratamento: _____

Outros medicamentos: _____

Outras alterações sistêmicas: _____

HIV: _____

História Odontológica

Faz tratamento odontológico? _____

Condição bucal:

- Desdentado total
- Desdentado total com prótese
- Desdentado parcial
- Desdentado parcial com prótese
- Implantes dentários
- Aparelho ortodôntico fixo
- Aparelho ortodôntico removível
- Sangramento Gengival
- Perda de inserção clínica. Total de dentes com PIC: _____

Total de dentes ausentes: _____

Necessidade de tratamento: Sim Não

Encaminhamento: _____

Apêndice B – Ficha de anamnese utilizada para os indivíduos do grupo controle.

Nº

Dados Pessoais

Nome: _____

Data de Nascimento: ___/___/___ Idade: _____ Gênero: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Telefone: () _____

RG: _____ CPF: _____

História Médica

Há quanto tempo foi sua última consulta médica? _____

Qual o motivo? _____

No momento está fazendo algum tratamento médico? () Sim () Não

Qual tratamento? _____

Está tomando algum medicamento? () Sim () Não

Qual? _____

Está grávida? _____ Toma anticoncepcional? _____

Consome bebida alcoólica? _____ Com que frequência? _____

Consome algum tipo de droga? _____

Fumante? _____

História Odontológica

Faz tratamento odontológico? _____

Condição bucal:

- Desdentado total
- Desdentado total com prótese
- Desdentado parcial
- Desdentado parcial com prótese
- Implantes dentários
- Aparelho ortodôntico fixo
- Aparelho ortodôntico removível
- Sangramento Gengival
- Perda de inserção clínica. Total de dentes com PIC: _____

Total de dentes ausentes: _____

Necessidade de tratamento: Sim Não

Encaminhamento: _____

Apêndice C – Quadro demonstrativo dos indivíduos dos grupos tuberculose e controle incluídos no estudo de acordo com gênero e idade.

Quadro 14 – Distribuição de indivíduos dos grupos tuberculose e controle incluídos no estudo de acordo com gênero e idade (Continua)

Grupo Tuberculose		Grupo Controle		Gênero
Paciente	Idade	Paciente	Idade	
01	33	51	36	Masculino
02	48	52	47	Masculino
03	59	53	62	Masculino
04	47	54	49	Feminino
05	32	55	32	Masculino
06	30	56	31	Masculino
07	37	57	37	Masculino
08	35	58	34	Feminino
09	53	59	53	Masculino
10	72	60	73	Feminino
11	64	61	64	Masculino
12	36	62	33	Feminino
13	21	63	21	Feminino
14	20	64	21	Feminino
15	26	65	28	Masculino
16	30	66	33	Masculino
17	47	67	47	Feminino
18	69	68	66	Masculino
19	33	69	32	Masculino
20	37	70	37	Masculino
21	40	71	41	Feminino
22	29	72	30	Masculino
23	37	73	35	Feminino
24	54	74	55	Masculino
25	36	75	38	Feminino
26	59	76	60	Masculino
27	60	77	60	Masculino
28	26	78	25	Masculino
29	45	79	42	Masculino
30	34	80	34	Feminino

Quadro 14 – Distribuição de indivíduos dos grupos tuberculose e controle incluídos no estudo de acordo com gênero e idade (Conclusão)

Grupo Tuberculose		Grupo Controle		Gênero
Paciente	Idade	Paciente	Idade	
31	25	81	24	Feminino
32	24	82	23	Masculino
33	24	83	23	Masculino
34	28	84	30	Feminino
35	28	85	28	Masculino
36	53	86	55	Masculino
37	43	87	42	Masculino
38	25	88	26	Masculino
39	70	89	71	Masculino
40	54	90	54	Masculino
41	68	91	67	Feminino
42	20	92	20	Masculino
43	51	93	48	Masculino
44	54	94	55	Feminino
45	25	95	26	Feminino
46	41	96	41	Masculino
47	60	97	62	Masculino
48	73	98	72	Masculino
49	45	99	46	Masculino
50	37	100	36	Feminino

QUERIDO, S. M. R. **Superinfecting microorganisms in the oral cavity of individuals undergoing antibiotic therapy for pulmonary tuberculosis treatment.** 2006. 157f. Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, São José dos Campos, 2006.

ABSTRACT

Superinfection results an overgrowth of potentially harmful resident or other opportunistic pathogens and can further represent a complication of an antimicrobial therapy that alters a beneficial microbiota. The present study evaluated the presence of yeasts, staphylococci, enteric rods and pseudomonads in the oral cavity and gingival sulcus of individuals with pulmonary tuberculosis undergoing antibiotic treatment and controls individuals. There were included 50 individuals diagnosed with pulmonary tuberculosis that were submitted to antibiotic therapy during a minimal period of 45 days and maximum 6 months. Systemically health individuals were included in the control group. Samples from oral cavity were collected through oral rinses and subgingival samples were taken using sterile paper points. Samples were cultured in duplicate onto Sabouraud dextrose agar with chloramphenicol, manitol agar and MacConkey agar. The isolates of Candida spp. and coagulase-positive staphylococci were identified by phenotypic characterization and the isolates of coagulase-negative staphylococci, enteric rods and pseudomonads were identified by API system. Data were analyzed statistically by Mann-Whitney test ($p < 0.05$). Candida spp. were detected in the oral cavity of pulmonary tuberculosis individuals in a significant higher number when compared to controls, and C. albicans was the most prevalent specie found in both groups. No significant statistical differences were observed between the groups related to Staphylococcus spp., enteric rods and pseudomonads. It was concluded that individuals with pulmonary tuberculosis showed significant increase in the quantity of Candida spp. concerning controls.

KEY-WORDS: tuberculosis, pulmonary; superinfection; bacteria; yeasts; Candida; mouth; human; “in vivo”.