

ELLEN CRISTINA GAETTI JARDIM

**FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
MICRORGANISMOS SUPERINFECTANTES OU
OPORTUNISTAS NA CAVIDADE BUCAL: RELAÇÕES COM
PRÓTESES TOTAIS, CONDIÇÕES PERIODONTAIS E
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

ARAÇATUBA
2009

ELLEN CRISTINA GAETTI JARDIM

**FATORES ASSOCIADOS À PRESENÇA DE
MICRORGANISMOS SUPERINFECTANTES OU
OPORTUNISTAS NA CAVIDADE BUCAL: RELAÇÕES COM
PRÓTESES TOTAIS, CONDIÇÕES PERIODONTAIS E
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia,
Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como parte integrante dos
requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de
concentração em Estomatologia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Pires Soubhia
Co-orientador: Prof. Dr. Idelmo Rangel Garcia
Júnior

ARAÇATUBA
2009

Catalogação-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- G129f Jardim, Ellen Cristina Gaetti
Fatores associados à presença de microrganismos superinfec-
tantes ou oportunistas na cavidade bucal : relações com próteses
totais, condições periodontais e susceptibilidade a antimicrobianos /
Ellen Cristina Gaetti-Jardim. - Araçatuba : [s.n.], 2009
116 f. : il. + 1 CD-ROM
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia, Araçatuba, 2009
Orientador: Profa. Ana Maria Pires Soubhia
Co-orientador: Prof. Idelmo Rangel Garcia Júnior
1. Boca 2. Enterobacteriaceae 3. Leveduras 4. Reação em
cadeia da polimerase
- Black D64
CDD 617.63

DADOS CURRICULARES

ELLEN CRISTINA GAETTI JARDIM

NASCIMENTO	17/05/1984 – São Paulo – SP
FILIAÇÃO	Elerson Gaetti Jardim Elza Fernandes Jardim
2003/2006	Graduação Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP
2007/2008	Obtenção dos créditos referentes ao Curso de Pós-Graduação em Odontologia, área de Estomatologia, em nível de Mestrado Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Elerson** e **Elza**, e a minha vovó **Cecília** exemplos de vida.

O incentivo e o apoio incondicional que me deram durante toda minha vida
foram fundamentais para chegar até aqui.

Aos meus irmãos, **Elerson** e **Elton**, pelo carinho e por todo incentivo.

Aos meus **familiares** e **amigos**.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À pessoa mais maravilhosa e perfeita que já existiu. Obrigada pela dádiva, orgulho e honra de dizer a plenos pulmões que sou sua filha. À minha mamãe, **Elza Fernandes Jardim**, dedico esta, e todas as realizações da minha vida.

À minha querida vovózinha, **Cecília Gaetti Jardim**, obrigada pelo carinho, paciência e apoio incondicional em toda a minha vida. Poucas são as palavras para descrever o meu amor; obrigada por tudo.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ter me dado o dom da vida e permitir que os meus desejos pudessem ser transformados em realidade.

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba – UNESP, na pessoa do seu diretor Prof. Dr. **Pedro Felício Estrada Bernabé**, pela oportunidade de realização dos cursos de graduação e mestrado.

Ao meu irmão, **Elerson Gaetti Jardim Júnior**, por abdicar de horas de descanso, por me ajudar em todos os projetos da minha vida e por desejar que eu sempre cresça e me torne um profissional melhor.

À minha orientadora, Profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia**, pela liberdade de ação.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. **Idelmo Rangel Garcia Júnior**, pela paciência e compreensão.

Aos Coordenadores do Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, Prof. Dr. **Idelmo Rangel Garcia Júnior** e Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi**.

Aos meus grandes amigos **Ana Laura, Eduardo, Luciano, Mariene e Tatiana** por todos os bons momentos vividos durante a graduação. Em especial **Anderson, Angélica e Leonardo**, sem os quais os compromissos da pós-graduação ficariam muito mais difíceis. A amizade, o apoio e incentivo de vocês foram fundamentais.

Aos queridos amigos de pós-graduação, especialmente, da área de Estomatologia; por estes anos de convivência.

Às minhas queridas amigas e mestres, **Jéssica Lemos Gulinelli e Thallita Pereira Queiroz**, pelo carinho, amizade e auxílio incondicional.

Aos **docentes e funcionários** do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP.

Aos **funcionários** da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela paciência, atenção e orientação.

Aos **bibliotecários** da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, pela dedicação, ensinamentos, colaboração e presteza durante todo o período de elaboração deste trabalho.

À Profa. Dra. **Alessandra Marcondes Aranega**, da disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial, pelo carinho que sempre me concedeu.

À **FAPESP**, pelo auxílio à pesquisa concedido.

Àqueles que direta ou indiretamente contribuíram durante essa fase.

GAETTI-JARDIM, EC. Fatores associados à presença de microrganismos superinfectantes ou oportunistas na cavidade bucal: relações com a presença de próteses totais, condições periodontais e susceptibilidade a antimicrobianos. [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2009.

Resumo

Este estudo avaliou a ocorrência de bactéria entérica na cavidade oral em pacientes com periodontite, pacientes com gengivite, indivíduos periodontalmente saudáveis e pacientes edentados submetidos a tratamento odontológico com reabilitação protética na Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Quarenta e um edentados portadores de próteses totais, 89 pacientes com gengivite, 70 pacientes com periodontite e 50 indivíduos periodontalmente saudáveis foram submetidos a exame clínico, e as condições periodontais e bucais foram registradas. Foram coletadas amostras de saliva, mucosa bucal, gengiva e biofilme supra e subgengival e bactérias foram detectados por cultura e PCR. Os microrganismos-alvo foram isolados de 75,61% dos pacientes edentados, 25,84% dos pacientes com gengivite, 30% dos pacientes com periodontite e de 18% dos indivíduos saudáveis. Por PCR, as frequências de detecção foram 87,8%, 38,2%, 64,295 e 18%, respectivamente. Significativa resistência aos antimicrobianos foi observada na maioria dos isolados, e verificou-se uma grande heterogeneidade dos marcadores resistentes à ampicilina e tetraciclina.

Palavras-chaves: Boca, *Enterobacteriaceae*, Leveduras, Reação em cadeia da Polimerase

GAETTI-JARDIM, EC. Factors associated with the presence of superinfecting microorganisms or opportunistic in the oral cavity: relations with the presence of total denture, periodontal status and susceptibility to antibiotics. [dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – UNESP; 2009.

Abstract

This study evaluated the occurrence of enteric bacteria in oral cavity of periodontitis patients, gingivitis patients, periodontally healthy subjects and edentulous patients wearing complete denture undergoing dental treatment in Araçatuba School of Dentistry. Forty one edentulous wearing complete dentures, 89 gingivitis patients, 70 periodontitis patients and 50 periodontally healthy subjects were submitted to clinical examination, and periodontal and oral conditions were registred. Saliva, oral mucosa, subgingival and supra gingival biofilm samples were colleted and enteric bacteria were detected by culture and PCR. Targeted microorganisms were isolated from 75,61% of edentulous patients, 25,84% of gingivitis patients, 30% of periodontitis patients and from 18% of healthy individuos. By PCR, the detection frequencies were 87,8%, 38,2%, 64,29% and 18%, respectively. Significant resistance to antimicrobial agents was observed in most of isolates, and it was verried a great heterogeneity of resistance markers to ampicillin and tetracycline.

Key-words: Mouth, *Enterobacteriaceae*, Yeasts, Polymerase Chain Reaction

Lista de Tabelas

Artigo 1: Ocorrência de bactérias entéricas, pseudomonados e leveduras na cavidade oral: relação com condições periodontais e presença de prótese total

Tabela 1 -	Pares de Primer usados na amplificação do DNA.	59
Tabela 2 -	Detecção de bactérias entéricas, pseudomonados e leveduras em pacientes edêntulos, pacientes com gengivite ou periodontite. Resultados obtidos por cultura.	60
Tabela 3 -	Detecção das bactérias alvo por PCR.	61
Tabela 4 -	Fatores associados com a presença de bactérias alvo e fungos na cavidade oral de edêntulos, pacientes com gengivite e periodontite.	62

Artigo 2: Resistência a antimicrobianos de microrganismos isolados da cavidade oral de pacientes com baixo padrão de higiene oral.

Tabela 1 -	Susceptibilidade a β -lactâmicos de aeróbios e anaeróbios facultativos isolados da cavidade oral de edêntulos, pacientes com gengivite e periodontite.	99
Tabela 2 -	Susceptibilidade a β -lactâmicos de 280 isolados de anaeróbios estritos e microaerófilos isolados da cavidade oral em pacientes edêntulos, pacientes com gengivite e periodontite.	101
Tabela 3 -	Susceptibilidade a amicacin, cloramfenicol, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina, ácido nalidíxico, rifampicina, e tetraciclina de aeróbios e anaeróbios facultativos isolados da cavidade oral de pacientes edêntulos com prótese total, pacientes com gengivite e pacientes com periodontite.	103
Tabela 4 -	Susceptibilidade a clindamicina, doxiciclina, metronidazol, rifampicina e tetraciclina de 270 isolados de anaeróbios estritos e microaerófilos isolados da cavidade oral	

de pacientes edêntulos usuários de prótese total, pacientes com gengivite e pacientes com
periodontite.

Lista de Abreviaturas

PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase
µl -	microlitro
EVA -	Etil violeta azida
µg -	Micrograma
ml –	Mililitro
nm –	Nanometro
dNTP -	DesoxiAdenosina Trifosfatada
UV –	Ultravioleta
MIC –	Mínima concentração inibitória
CLSI -	Clinical and Laboratory Standards Institute
ATCC –	American Type Culture Collection

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	23
2. Artigo 1: Ocorrência de bactérias entéricas, pseudomonados e leveduras na cavidade oral: relação com condições periodontais e presença de prótese total.	26
2.1 Resumo	28
2.2 Abstract	30
2.3 Introdução	32
2.4 Proposição	35
2.5 Materiais e métodos	37
2.6 Resultados	43
2.7 Discussão	46
2.8 Conclusões	52
2.9 Referências	55
3. Artigo 2: Resistência a antimicrobianos de microrganismos isolados da cavidade oral de pacientes com baixo padrão de higiene oral	63
3.1 Resumo	65
3.2 Abstract	67
3.3 Introdução	69
3.4 Proposição	72

3.5 Materiais e métodos	74
3.6 Resultados	80
3.7 Discussão	83
3.8 Conclusões	90
3.9 Referências	93
Anexos Gerais	107

1. Introdução Geral

A complexa microbiota bucal é composta por mais de 500 diferentes espécies microbianas, a maioria delas associadas com a saúde bucal. Contudo, por vezes, o equilíbrio entre sistema imune do hospedeiro e da virulência microbiana está perdido e as infecções oportunistas podem surgir. Assim, as doenças infecciosas orais têm sido frequentemente associadas à alterações da resposta do sistema imunológico, a má higiene bucal, desnutrição, e uso de álcool, que pode predispor à gengivite e periodontite. A associação entre a ocorrência de patógenos oportunistas e superinfectantes e as condições periodontais ou a presença de próteses totais, foram estabelecidos. No entanto, o papel da bactéria entérica e pseudomonados na etiologia das doenças periodontais permanece pouco clara. Nos pacientes edentados usuários de prótese total, a presença de microrganismos entéricos pode estar associada com o desenvolvimento de mucosite e geralmente reflete má higiene.

Enterobacteriaceae e outros microrganismos entéricos, assim como pseudomonados não são considerados importantes membros da microbiota bucal, e é possível que o desequilíbrio da microbiota bucal colabore para o seu estabelecimento no biofilme oral. Em seguida, supressão da microbiota bucal pelo abuso ou pelo uso intensivo de antibióticos pode facilitar uma persistente colonização da cavidade oral por estes microrganismos. Além disso, microrganismos entéricos frequentemente atuam como reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos e podem os espalhar para populações microbianas em infecções nosocomiais. Além do sulco gengival, língua e mucosa supragengival mais biofilme representam potenciais anatômicos para estes microrganismos entéricos.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença de microrganismos entéricos, pseudomonados e leveduras na cavidade bucal de pacientes com gengivite, periodontite, indivíduos saudáveis periodontalmente e pacientes edentados que usam próteses totais, bem

como determinar os padrões de susceptibilidade antimicrobiana dos isolados e a presença de marcadores genéticos de resistência aos principais antimicrobianos.

Ocorrência de bactérias entéricas, pseudomonados e leveduras na cavidade oral: relação com condições periodontais e presença de prótese total

Esse estudo foi desenvolvido parcialmente com recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (Proc. No. 07/54851-0)

* Este artigo foi escrito de acordo com as normas do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* (Anexo A).

2.1 *Resumo*

O estudo avaliou a ocorrência de bactérias entéricas, pseudomonados e leveduras na cavidade oral de pacientes com periodontite, gengivite, indivíduos periodontalmente saudáveis e usuários de prótese total submetidos a tratamento na Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Quarenta e um usuários de prótese total, 89 pacientes com gengivite, 70 pacientes com periodontite e 50 periodontalmente sadios foram submetidos a exame clínico e registro das condições oral e periodontal. Saliva, mucosa oral, amostras de biofilme subgengival e supragengival foram coletados e os microrganismos alvo foram detectados por cultura e PCR. Microrganismos entéricos e pseudomonados foram cultivados em 75,61% dos pacientes edêntulos, 25,84% dos pacientes com gengivite, 30% dos pacientes com periodontite e em 18% dos indivíduos saudáveis. Através do PCR, as frequências de detecção foram 87,8%, 38,2%, 64,29% e 18%, respectivamente. Leveduras foram frequentemente isoladas de pacientes com prótese total sendo a *Candida albicans* a predominante. A ocorrência de *Candida* spp. Foi estatisticamente associada à detecção de microrganismos entéricos, higiene das próteses e tempo de uso dessas últimas, índice de placa e uso prévio de agentes antimicrobianos.

Palavras-chave: Cavidade Bucal, Bactérias Entéricas, Reação em Cadeia da Polimerase

2.2 *Abstract*

This study evaluated the occurrence of enteric bacteria, pseudomonads and yeasts in the oral cavity of periodontitis patients, gingivitis patients, periodontally healthy subjects and edentulous patients wearing complete denture undergoing dental treatment in Araçatuba Dental School. Forty one edentulous wearing complete dentures, 89 gingivitis patients, 70 periodontitis patients and 50 periodontally healthy subjects were submitted to clinical examination, and periodontal and oral conditions were registered. Saliva, oral mucosa, subgingival and supra gingival biofilm samples were collected and enteric bacteria were detected by culture and PCR. Enteric microorganisms and pseudomonads were cultivated from 75.61% of edentulous patients, 25.84% of gingivitis patients, 30% of periodontitis patients and from 18% of healthy individuals. By PCR, the detection frequencies were 87.8%, 38.2%, 64.29% and 18%, respectively. Yeasts were commonly isolated from patients with complete denture and *Candida albicans* was the most frequent. The occurrence of *Candida* spp. was statistically associated to detection of enteric microorganisms, hygiene of the prostheses, age of prosthetic devices, plaque index and previous use of antimicrobial agents.

Key-words: Oral Cavity, Enteric Bactérias, Polymerase Chain Reaction

2.3 *Introdução*

As doenças infecciosas na cavidade oral têm sido freqüentemente associadas a alterações na resposta imunológica, falta de higiene oral, desnutrição severa, tabagismo, alcoolismo e diabetes, os quais podem predispor o indivíduo ao desenvolvimento de gengivite e periodontite (1,2). Além desse aspecto, a relevância da resposta imune local e sistêmica na proteção dos tecidos periodontais está documentada, sendo que seu comprometimento leva à deterioração das condições dos tecidos de suporte (3), bem como facilita a colonização da cavidade oral por microrganismos superinfectantes, como as bactérias entéricas e pseudomonados (4).

Associações entre as condições periodontais (2,5), ou a presença de prótese total (6), e a ocorrência de patógenos oportunistas e superinfectantes vêm sendo avaliadas. Contudo, o papel das bactérias entéricas e pseudomonados na etiologia da doença periodontal ou estomatite protética permanece sem o adequado esclarecimento (4).

A despeito da relevância desses microrganismos na patogênese de muitas infecções oportunistas (4,7,8), a maioria dos dados sobre a ocorrência de microrganismos oportunistas e superinfectantes na cavidade oral são relacionados a pacientes com severa depressão do sistema imunológico, particularmente pacientes HIV-positivos (4,9), ou apresentando debilidades físicas ou mentais (10), sendo que a ocorrência destes microrganismos em pacientes com diferentes condições de saúde bucal ou portadores de próteses totais ainda permanece incerta, a despeito do fato de que são causas freqüentes de pneumonias por aspiração, particularmente em idosos. (6,8).

Em pacientes edêntulos portadores de prótese total, a presença de microrganismos entéricos e leveduras pode ser associada com o desenvolvimento de mucosite e condições precárias de higiene (6). Nesse sentido, a estomatite associada às próteses totais é considerada

uma das formas mais comuns de candidose bucal, sendo que em pacientes dentados, além de gengiva, língua e mucosa oral, o próprio biofilme supragengival e subgengival pode representar sítios anatômicos potenciais para colonização desses microrganismos (4,11). Nesses casos, a saliva se comportaria como um veículo de disseminação intra e extra bucal desses grupos microbianos.

A família *Enterobacteriaceae* e outros microrganismos entéricos, bem como os pseudomonados, não são considerados membros da microbiota oral, mas é possível que o desequilíbrio da microbiota residente colabore para o estabelecimento desses microrganismos oportunistas no biofilme (12). Assim, a supressão da microbiota bucal devido ao uso abusivo ou intensivo de antimicrobianos pode facilitar a colonização da boca por estas bactérias e fungos oportunistas, sendo que esses microrganismos agem como reservatórios de genes de resistência a antimicrobianos (13) e podem disseminar esses marcadores de resistência para as populações microbianas bucais susceptíveis ou para outros sítios anatômicos, principalmente em infecções nosocomiais, onde esses grupos microbianos se mostram profundamente ligados a infecções sistêmicas (14).

2.4 Proposição

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar a presença dessas bactérias entéricas, pseudomonados e leveduras na cavidade oral de pacientes com gengivite, periodontite, indivíduos periodontalmente saudáveis e pacientes edêntulos portadores de prótese total, correlacionando essa ocorrência com o histórico de emprego de drogas antimicrobianas, condições de higiene, idade e outros fatores socioeconômicos e culturais.

2.5 Materiais e Métodos

População Estudo

Participaram desse estudo um total de 250 pacientes, compreendendo 84 homens e 166 mulheres, com idade variando de 16 a 60 anos (média de 43,03 anos), atendidos em um período de 10 anos (fevereiro de 1998 a março de 2008), na Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP. Deste total, 41 eram usuários de prótese total, 89 apresentavam gengivite, 70 tinham evidências clínicas e radiográficas de periodontite crônica e 50 eram periodontalmente saudáveis. Todos os indivíduos deram consentimento livre e esclarecido para a realização do trabalho, que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista-UNESP (Protocolos 2002/01034).

Os históricos médico e odontológico dos pacientes foram obtidos através da anamnese e os pacientes foram submetidos a exames intra e extra bucais. Entre esses exames clínicos, procediam-se as avaliações das condições periodontais dos pacientes dentados. Estes pacientes mostraram ≥ 20 dentes, não necessitaram de pré-medicação antibiótica para exame periodontal, e não sofreram qualquer terapia periodontal 3 meses antes do exame. Pacientes com periodontite deviam ter com evidências clínicas de perda óssea excedendo 5 mm em 30% ou mais dos sítios periodontais; pacientes com gengivite evidenciaram inflamação dos tecidos gengivais em pelo menos 30% ou mais dos sítios anatômicos avaliados, mas sem características radiográficas de perda óssea, enquanto os pacientes periodontalmente saudáveis não apresentaram qualquer evidência de perda óssea e inflamação gengival (15). Nesses pacientes dentados, avaliava-se também o sangramento à sondagem, o índice gengival, bem como a profundidade de sondagem. O critério de exclusão incluiu história de auto-medicação, diabetes, doença auto-imune ou outra patologia sistêmica.

Em pacientes edêntulos usuários de prótese total, a presença de patologias inflamatórias na mucosa oral e condições de higiene da prótese foram também registradas como descrito por Daniluk et al. (6).

Coleta e Processamento das Amostras Clínicas, Isolamento e Identificação dos Microrganismos.

Previamente à coleta dos espécimes clínicos, os pacientes foram orientados a não beber, comer ou higienizar a boca 1 hora antes. Após exame clínico, procedeu-se a coleta de amostras de saliva, mucosa oral, língua, biofilme supragengival e subgengival de pacientes periodontalmente saudáveis, portadores de gengivite e aqueles portadores de periodontite. Os espécimes clínicos foram obtidos do sítio periodontal mais atingido pela gengivite ou periodontite, como avaliado através da profundidade clínica de sondagem e inflamação gengival.

As amostras supragengivais foram obtidas através de curetas periodontais e transferidas em meio de transporte VMGA III (16) e água ultrapura Milli Q. Amostras subgengivais foram obtidas por meio de cones de papel absorvente (Dentsplay, Ind. Co. Ltd., RJ, Brazil) inseridos na região mais apical das bolsas periodontais ou sulcos gengivais, onde permaneciam por 60s, e eram transportados para o meio VMGA III e água ultrapura Milli Q.

Amostras da mucosa oral foram obtidas por meio de zaragatoas alginatadas esterilizadas e transferidas para VMGA III e 300µl de água ultrapura Milli Q. A saliva foi coletada com a utilização de dispositivos Salivette (Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Germany), que eram posteriormente centrifugados a 5000xg por 2 minutos e a saliva era imediatamente diluída em VMG I e inoculada em vários meios de cultura de cultura seletivos e não seletivos. Todas as amostras clínicas foram processadas em, no máximo, 2 horas após a coleta.

Dos pacientes edêntulos portadores de prótese total, foram obtidas as amostras clínicas do palato, dorso de língua e superfície das próteses com a utilização de zaragatoas alginatadas esterilizadas (6), as quais também foram transferidas para o meio de transporte VMGA III e água ultrapura MilliQ.

Os espécimes clínicos foram inoculados em água peptonada e caldo azida etil violeta (caldo EVA, Difco) e incubados em temperatura ambiente e 37°C, por 3-7 dias. Após esse período, dos tubos com crescimento microbiano na água peptonada, alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para o agar eosina azul de metileno (Difco), agar SS, agar MacConkey e agar verde brilhante. Dos tubos contendo caldo EVA e crescimento microbiano, 0,1 ml foi transferido a agar Bile Escilina. As placas eram incubadas em aerobiose a 37°C, por 48h (4). A identificação dos isolados era realizada de acordo com suas características coloniais, tintoriais (coloração de GRAM), crescimento em 10% de cloreto de sódio, produção de gás a partir de glicose, e testes bioquímicos usando o “kit” comercial API-20E comercial (BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, França).

Para isolamento das leveduras, as amostras clínicas foram diluídas em água peptonada e transferidas para agar Sabouraud Dextrose acrescido de 100 µg/ml de cloranfenicol e incubadas a temperatura ambiente e a 37°C, por 3-7 dias. A identificação de leveduras foi realizada através de testes de assimilação de nitrogênio e carbono, fermentação de carboidratos, formação de tubo germinativo (de 37°C e 39°C), morfologia colonial no agar CHROMagar *Candida* (MastDiagnostica, Paris, França), bem como crescimento a 37°C e 42°C (4).

Deteção de Patógenos Bacterianos por PCR

O DNA presente nas amostras clínicas transportadas em água ultrapura Milli Q foi extraído usando o “kit” comercial DNA Mini Kit QIAamp (Qiagen, Hilden, Alemanha), de

acordo com as instruções do fabricante. A concentração do DNA bacteriano foi determinada por espectrofotometria (Model DU-640, Beckman Instruments, Richmond, Wash, Estados Unidos) a A_{260} nm. A presença de membros da família *Enterobacteriaceae* (17), do gênero *Enterococcus* spp. (18), de *E. faecalis*, *E. faecium* (19), do gênero *Pseudomonas* spp. e da espécie *P. aeruginosa* (20) foi avaliada por PCR usando pares de iniciadores específicos (Tabela 1).

Amplificações do PCR foram feitas em volumes de 25 μ L contendo tampão 1X PCR/Mg⁺⁺ (Boehring Mannheim, Indianapolis, IN, Estados Unidos), 0.2 mM de cada dNTP (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, Estados Unidos), 0.5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), 0.4 μ M de cada par de iniciadores (Invitrogen) e 10 ng de DNA. As amplificações foram feitas em termociclador (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 9700, Norwalk, CT, USA) programadas para um ciclo inicial de 94°C (5 min), para desnaturação do DNA, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s; temperatura de anelamento para cada par de iniciadores, por 1 min.; 72°C por 1 min., e então 72°C por 5 min, para permitir a completa extensão das fitas de DNA.

Os produtos da amplificação foram comparados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão 1X TBE, corado com brometo de etídio (0.5 mg/mL) e fotografado sobre transiluminador de luz ultravioleta (UV) (Kodak Digital Science, Electrophoresis Documentation Analysis System 120, Eastman Kodak Co., NY, USA). Em todas as reações de amplificação utilizou-se o DNA de cepas de referência como controle positivo e o marcador de peso molecular 1kb DNA ladder (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil).

Estatísticas

A análise estatística foi feita usando o software “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS Inc v.13, Chicago, IL, USA). A frequência de detecção dos microrganismos

foi avaliada para cada item analisado. Diferenças significativas na ocorrência dos diferentes microrganismos entre os grupos de pacientes foram analisadas utilizando os testes de Mann-Whitney, Qui-quadrado e teste exato de Fisher. Associações entre a prevalência de diferentes microrganismos e parâmetros clínicos foram examinadas por regressão logística multivariada. Uma diferença de $P < 0.05$ foi considerada estatisticamente significativa.

2.6 Resultados

Pela cultura, microrganismos entéricos e pseudomonados foram encontrados em 75,61% dos pacientes edêntulos usuários de prótese total, 18% dos pacientes periodontalmente saudáveis, 25,84% dos pacientes com gengivite e 30% dos pacientes com periodontite (Tabela 2). Os microrganismos mais frequentemente detectados foram dos gêneros *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Pseudomonas*.

No entanto, pelo uso do PCR, as espécies da família *Enterobacteriaceae* foram detectadas, respectivamente, em 78,04%, 30%, 37,08% e 44,29% dos pacientes edêntulos, saudáveis, pacientes com gengivite e aqueles com periodontite, respectivamente (Tabela 3). Várias amostras clínicas possuíam 2 ou mais espécies concomitantemente. Pelo método do PCR, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* foram as espécies mais comumente detectadas (Tabela 3).

Em relação à detecção de leveduras, a presença de *Candida* sp. foi verificada em 70,73% dos pacientes usuários de prótese total, 15,73% dos pacientes com gengivite, 18,57% dos pacientes com periodontite e em 14% das amostras dos indivíduos periodontalmente saudáveis. Os isolados mais comumente observados foram *C. albicans* e *C. glabrata*, sendo que *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* foram isoladas de algumas amostras, especialmente de pacientes edêntulos (Tabela 2).

A ocorrência de leveduras, bactérias entéricas e pseudomonados em pacientes edêntulos mostrou estar inter-relacionada ($P= 0.029$). Similarmente, foi verificada associação estatística entre falta de higiene com os dispositivos protéticos e ocorrência desses microrganismos ($P= 0.024$), bem como com a idade das próteses (idade > 5 anos, $P < 0.01$) e presença de candidose ($P= 0.041$). A presença concomitante de trauma local e lesões hiperplásicas na mucosa não foram estatisticamente significantes.

Em pacientes com gengivite e os com periodontite, higiene oral precária ($P= 0.046$) e

uso prévio de agentes antimicrobianos foram estatisticamente associados com a ocorrência dos microrganismos alvo. A presença de sangramento à sondagem ($P=0.078$) e perda de inserção ($P=0.092$) não estiveram relacionados com a ocorrência desses microrganismos, sendo que a presença desses microrganismos não mostrou correlação com nenhum fator avaliado ou condição clínica.

2.7 *Discussão*

Os microrganismos entéricos, os pseudomonados e as leveduras têm sido envolvidos em infecções intra e extra bucais, e estudos têm evidenciado que a própria cavidade bucal pode agir como reservatório desses patógenos oportunistas e seus genes de resistência a antimicrobianos (4,5,13). No entanto poucos dados suportam a participação desses microrganismos entéricos no desenvolvimento de estomatite protética, particularmente em associação com leveduras (6,21) ou na patogênese de doenças periodontais (4,5).

A colonização da orofaringe com bacilos entéricos GRAM-negativos pode ser um fator que contribui para a patogênese da pneumonia aspirativa, que é a mais comum causa de morte entre pacientes idosos debilitados (8,10). Além desse aspecto, a presença de bastonetes GRAM-negativos entéricos, enterococos ou pseudomonados em pacientes edêntulos usuários de prótese total pode representar um risco maior de infecções sistêmicas (6). Contudo, a distribuição de patógenos extra bucais na população de baixa renda com higiene bucal deficiente ainda permanece sem o adequado esclarecimento. Assim, é de grande importância o fato de que muitos microrganismos cultivados (Tabela 2) ou detectados por PCR (Tabela 3) são associados com pneumonia aspirativa (8).

Por vezes, é difícil discernir efeitos diretamente associados ao envelhecimento sobre a composição da microbiota e condições de saúde bucais, porque nos idosos um número relevante de outros fatores concomitantes, como xerostomia, medicamentos, próteses, também podem causar mudanças (22). No presente estudo, quando a microbiota de pacientes com diferentes condições periodontais ou portadores de prótese total são comparados, os dados não evidenciam diferença estatisticamente significativa. Contudo, as dimensões dos grupos experimentais e as particularidades dos voluntários não permitiam comparações seguras entre pacientes com diferentes idades.

A relação entre a ocorrência de bastonetes entéricos e o uso de prótese total necessita de avaliações. Os resultados de Marsh et al. (22) e Gosney et al. (10) não evidenciaram qualquer associação entre esses fatores, enquanto Daniluk et al. (6) detectou uma alta frequência de colonização por estas bactérias entéricas e pseudomonados em usuários de prótese total.

No presente ensaio, higiene oral precária e manutenção insatisfatória das próteses totais foram significativamente associadas com colonização da mucosa e próteses por microrganismos superinfectantes e leveduras, bem como a concomitante ocorrência de candidose, sendo que a presença desses microrganismos em pacientes edêntulos com higiene oral e manutenção das próteses satisfatórias esses microrganismos foram detectados em 56,25% das amostras de mucosa, enquanto em pacientes com pobre padrão de higiene essa frequência de detecção foi de 88%, valores considerados muito elevados se comparados aos da literatura (6,21).

A composição da microbiota oral é estreitamente relacionada com as propriedades físicas e químicas das diferentes superfícies da boca, que incluem a presença de receptores de adesão microbiana, o potencial de óxido-redução do sítio anatômico, a presença de nutrientes e receptores para a adesão microbiana. Em anos recentes, tem-se observado em envelhecimento progressivo e rápido da população brasileira devido à combinação entre uma melhora na expectativa de vida e uma redução profunda da taxa de natalidade, sendo que uma parcela muito grande dessa população mais idosa utiliza ou utilizará prótese total, suportada ou não por implantes.

Outro aspecto que merece consideração reside no fato de que pacientes portadores de prótese total freqüentemente consomem alimentos mais moles, dietas ricas em carboidratos, os quais podem favorecer a adesão de *Candida* spp., particularmente na superfície acrílica das próteses (23,24).

Desde que infecções fúngicas são também relacionadas com situações de higiene bucal precária e uso de prótese total (6), é difícil o estabelecimento da relação entre a presença de bactérias entéricas, outros superinfectantes (como enterococos), leveduras e inflamação da mucosa. Entretanto, a presença de mediadores da inflamação podem ser associados com uma alta frequência de colonização por *Candida* e microrganismos entéricos (6). Nestes pacientes edêntulos portadores de prótese total e com baixo padrão de higiene bucal, a ocorrência de microrganismos entéricos pode ser associado com a halitose característica (25), sendo que provavelmente a idade do dispositivo protético pode favorecer a colonização da cavidade oral por microrganismos superinfectantes por criar áreas de retenção de resíduos alimentares, uma vez que a ocorrência de trauma mecânico não mostrou correlação com a frequência de detecção dos microrganismos alvo ($P=0,078$) e a higiene dessas próteses mais antigas quase sempre era insatisfatória.

No presente estudo, a maioria dos pacientes usuários de prótese total era do gênero masculino e de meia idade, consumidores crônicos de tabaco e álcool. É sabido que o tabaco, o álcool e o uso de próteses podem aumentar a colonização por patógenos oportunistas, particularmente os fungos. A maior parte das infecções fúngicas na cavidade oral comumente envolve *C. albicans* (26,27), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* (27) e *Candida krusei* (28). Neste estudo, *C. albicans* foi o fungo mais frequentemente detectado, mas outras espécies também foram isoladas das amostras clínicas, em menor número.

Isolados do gênero *Candida* vêm sendo observados em 10% a 80% dos indivíduos sadios, geralmente em número reduzido (29), mas em pacientes seriamente debilitados, essas leveduras podem causar superinfecções locais ou sistêmicas (30). A tabela 2 evidenciou uma grande ocorrência de leveduras em pacientes edêntulos, a maioria deles idosos, justificando novas abordagens na manutenção dos cuidados com as próteses a fim de prevenir a colonização fúngica e a ocorrência de micoses oportunistas.

A patogênese da gengivite e, principalmente, periodontite depende da participação de microrganismos específicos, que desempenham diferentes papéis no desenvolvimento do processo inflamatório e uma única espécie microbiana não é capaz de iniciar ou exacerbar o processo de perda óssea e destruição dos tecidos periodontais (4). Além desse aspecto, em pacientes com imunossupressão, ou submetidos a terapia antimicrobiana por longos períodos, bem como pacientes com necessidades especiais, o desenvolvimento da doença periodontal pode ser associado com o estabelecimento de microrganismos entéricos e superinfectantes na cavidade oral, os quais abrigam diversos marcadores para resistência a antimicrobianos (4,13,31,32). Deste modo, a ocorrência destas bactérias pode afetar o padrão de susceptibilidade da microbiota oral e o uso de drogas como adjuvante no tratamento da periodontite deve levar esse aspecto em consideração, como recomendam Slots & Ting (33).

Os dados apresentados no presente estudo mostram que, embora os microrganismos alvo tenham sido isolados de 18% dos indivíduos periodontalmente saudáveis, em 25,84% e 30% dos portadores de gengivite e periodontite, respectivamente, não foram observadas correlações com as condições clínicas periodontais, nem do ponto de vista qualitativo (as diferentes espécies detectadas) ou quantitativo (a participação desses microrganismos na população microbiana como um todo). No entanto, condições de higiene oral foram inversamente proporcionais a ocorrência destes microrganismos superinfectantes ($P= 0.046$), como previamente sugerido por Slots et al. (34).

No presente estudo, a ocorrência de cocos GRAM-positivos entéricos, bastonetes GRAM-negativos e pseudomonados foi elevada, como também relatado por Gonçalves et al. (13), que detectaram esses microrganismos em 20% dos pacientes com periodontite crônica. Contudo, Diz Dios et al. (11), com pacientes HIV-positivo, evidenciaram próximos aos observados na Tabela 2, para pacientes com periodontite. Nesse sentido, a higiene bucal precária e o uso de drogas antimicrobianas, características freqüentemente observadas na

população brasileira, podem colaborar com o estabelecimento desses patógenos na cavidade oral, talvez com a mesma intensidade extensão que o comprometimento imunológico produz em alguns pacientes HIV-positivos.

A microbiota oral pode ser influenciada por antibióticos devido ao efeito direto dos mesmos durante a ingestão de drogas por via oral e pela secreção de drogas pelo sulco gengival ou saliva. Estes agentes antimicrobianos podem induzir supressão parcial da microbiota anaeróbia bucal e promover colonização da cavidade bucal por oportunistas exógenos resistentes a esses fármacos ou por espécies fúngicas, especialmente *Candida* spp. (35) e outros organismos superinfectantes (2,35).

De 17 pacientes que declararam uso de drogas antimicrobianas 3 meses antes da coleta das amostras, 13 usaram β -lactâmicos, drogas que reconhecidamente possuem efeitos significativos sobre a microbiota anaeróbia residente da cavidade bucal. Os resultados do presente estudo confirmam que o uso de drogas antimicrobianas pode colaborar para o estabelecimento de bactérias entéricas e leveduras na cavidade oral (Tabela 4). Se os dados são analisados em nível de espécies, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* foram as espécies mais beneficiadas com o uso de antimicrobianos pelos pacientes ($P=0,032$, $P= 0.028$, $P= 0.039$, respectivamente).

2.8 *Conclusões*

Diante do exposto pode-se concluir que:

- Embora participação desses microrganismos entéricos, fungos e pseudomonados no total da população microbiana seja pequena em termos relativos, a frequência de detecção dos mesmos é bastante elevada em todas as categorias de pacientes estudados;
- Dentre os fatores que favorecem a implantação desses microrganismos estão o uso de dispositivos protéticos e condições precárias de higiene;
- Nos pacientes portadores de próteses totais deve-se dar grande importância à manutenção das mesmas e à substituição da prótese quando a mesma não apresentar mais condições adequadas, visto que a inobservância desse cuidado eleva significativamente a ocorrência desses microrganismos

Agradecimentos

Os autores agradecem às Profas. Dras. Christiane Marie Schweitzer e Annie Schweitzer-Gaetti pela análise estatística do estudo e pela leitura crítica do manuscrito. Este estudo foi patrocinado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Proc. No. 07/54851-0

2.9 Referências

1. Walsh, M.C.; Kim, N.; Kadono, Y.; Rho, J.; Lee, S.Y.; Lorenzo, J.; Choi, J.. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Ann. Rev. Immunol.*, 23 (1), 33-63, 2006.
2. Aas, J.A.; Barbutto, S.M.; Alpagot, T.; Olsen, I.; Dewhirst, F.E.; Paster, B.J. (2007). Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients. *J. Clin. Periodontol.*, 34 (3), 189-195.
3. Cobb, C.M.; Ferguson, B.L.; Keselyak, M.T.; Holt, L.A.; MacNeill, S.R.; Rapley, J.W. A TEM/SEM study of the microbial plaque overlying the necrotic gingival papillae of HIV-seropositive necrotizing ulcerative periodontitis. *J. Periodont. Res.*, 38 (2), 147-55, 2003.
4. Gaetti-Jardim Júnior E; Nakano V; Wahasugui TC; Cabral FC; Gambá R; Avila-Campos MJ. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of hiv-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. *Braz. J. Microbiol* 39:257-261, 2008.
5. Barbosa, F.C.B.; Mayer, M.P.A.; Saba-Chujfi, E.; Cai, S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.*, 16: 306-310, 2001.
6. Daniluk, T.; Fiedoruk, K.; Ściepuk, M.; Zaremba, M.L.; Rożkiewicz, D.; Cylwik-Rokicka, D. Aerobic bacteria in the oral cavity of patients with removable dentures. *Adv Med Sci* 51(Suppl. 1): 86-90, 2006.
7. Gendron, R.; Grenier, D.; Maheu-Robert, L-F. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for local infections. *Microb. Infect.*, 2: 897-906, 2000.

8. Paju, S.; Scannapieco, F. A. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Diseases.*, 13:508-512, 2007.
9. Botero, J.E.; Arce, R.M.; Escudero, M.; Betancourth, M.; Jamarillo, H.; Contreras, A.. Frequency of detection of periodontopathic and superinfecting bacteria in HIV-positive patients with periodontitis. *J. Int. Acad. Periodontol.*, 9 (1): 13-18, (2007).
10. Gosney, M.; Punekar, S.; Playfer, J. R.; Bilsborrow P. K.; Martin, M. V. The incidence of oral GRAM-negative bacteria in patients with Parkinson`s disease. *Eur. J. Int. Med.*, 14: 484-487, 2003.
11. Diz Dios, P.; Feijoo, J.; Alvarez, F.J.; Castro, M.; Varela, J. Oral *Enterobacteriaceae* in HIV patients. *I International Conference of AIDS*, Berlin, Ger, p. 436, 1993.
12. Sixou, M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis.*, 9 (suppl. 1), 54-62, 2003.
13. Gonçalves, M.O.; Coutinho-Filho, W.P.; Pimenta, F.P.; Pereira, G.A.; Pereira, J.A.A.; Mattos-Guaraldi, A.L.; Hirata Jr, R. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett Appl Microbiol.* 44:488-94, 2007.
14. Chintu, L.; Bhat, G.J.; Walker, A.S.; Mulenga, V.; Sinyinza, F.; Lishimpi, K. et al. Cotrimoxazole as prophylaxis against opportunistic infections in HIV-infected Zambian children (CHAP): a double-blind randomized placebo-controlled trial. *Lancet*, 364 (9448): 1865-1871, 2004.
15. Tonetti, M.S.; Claffey, N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *J Clin Periodontol.*, 32:210-3, 2005.
16. Möller, Å.J.R. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift.*, 74:1-380, 1996

17. Fenollar, F.; Roux, V.; Stein, A.; Drancourt, M.; Raoult, D. Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J. Clin. Microbiol.*, 44(3): 1018-28, Mar. 2006.
18. Ke, D.; Picard, F.O.J.; Martineau, F.; Menard, C.; Roy, P.H.; Ouellette, M.; Bergeron, M.G. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol.*, 37:3497-3503, 1999.
19. Cheng, S.; McCleskey, F.K.; Gress, M.J.; Petroziello, J.M.; Liu, R.; Namdari, H.; Beninga, K. A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol*, 35(5): 1248-1250, 1997.
20. Spilker, T.; Coenye, T.; Vandamme, P.; LiPuma, J.J. PCR-based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.*, 42 (5): 2074-2079, 2004.
21. Girard Jr, B.; Landry, R.G.; Giasson, L.; Denture stomatitis: etiology and clinical considerations. *J. Can. Dent. Assoc.*, 62: 808-812, 1996.
22. Marsh, P. D.; Percival, R. S.; Challacombe, S. J. The influence of Denture-wearing and age on the oral microflora. *J. Dent. Res.*, 71: 1374-1381, 1992.
23. MacCourtie, J.; Douglas, L. J. Relationship between cell surface composition of *Candida albicans* and the adherence to acrylic after growth on different carbon sources. *Infect. Immun.* 32: 1234-41, 1981.
24. Nikawa, H.; Egusa, H.; Makihiro, S.; Yamashiro, H.; Fukushima, H.; Jin, C.; Nishimura, M.; Pudji, R. R.; Hamada, T. Alteration of the coadherence of *Candida albicans* with oral bacteria by dietary sugars. *Oral Microbiol. Immunol.*, 16: 279-283, 2001.
25. Golberg, S.; Cardash, H.; Browning, H.; Sahly, H.; Rosenberg, M. Isolation of Enterobacteriaceae from mouth and potential association with malodor. *J. Dent Res.*, 1770-5, 1997.

26. Stinnet, E.A.; Childers, N.K.; Wright, J.T.; Rodu, B.K.; Bradley, E.L. The detection of oral *Candida* in pediatric leukemia patients. *Pediatr Dent.*, 14:236-9, 1992.
27. Jham, B.C.; França, E.C.; Oliveira, R.R.; Santos, V.R.; Kowalski, L.P.; Freire, A.R.S. *Candida* oral colonization and infection in Brazilian patients undergoing head and neck radiotherapy: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 103:355-8, 2007.
28. Pfaller, M.; Wenzel, R. Impact of the changing epidemiology of fungal infections in the 1990's. *Eur J Clin Microbial Infect Dis.*, 11:287-91, 1992.
29. Abu-Elteen, K.H.; Abu-Alteen, R.M. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. *New Microbiol.*, 21:41-8, 1998.
30. Heimdahl A. Prevention and management of oral infections in cancer patients. *Support Care Cancer.*, 7:224-8, 1999.
31. Kaklamanos, E.G.; Charalampidou, M.; Menexes, G.; Topitsoglou, V.; Kalfas, S. Transient oral microflora in Greeks attending day centres for the elderly and residents in homes for the elderly. *Gerontol.*, 22: 158-167, 2005.
32. Souto, R.; Andrade, A.F.B.; Uzeda, M.; Colombo, A.P.V. Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol.*, 37: 208-215, 2006.
33. Slots, J.; Ting, M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol.*, 28 (1), 106-76, 2000.
34. Slots, J.; Rams, T.E.; Feik, D.; Taveras, H.D.; Gillespie, G.M. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J. Periodontol.*, 62, 543-547, 1991.
35. 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.*, 8:75-9, 1993.

Tabela 1. Pares de Primer usados na amplificação do DNA.

Microrganismo	Oligonucleotídeos	Temperatura de anelamento
<i>Enterobacteriaceae</i>	5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G-3' 5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3'	50°C
<i>Enterococcus</i> sp.	5'- TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G-3' 5'- AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC -3'	55°C
<i>E. faecalis</i>	5'- ATC AAG TAC AGT TAG TCT-3' 5'- ACG ATT CAA AGC TAA CTG-3'	47°C
<i>E. faecium</i>	5'-TTG AGG CAG ACC AGA TTG ACG-3' 5'-TAT GAC AGC GAC TCC GAT TCC-3'	50°C
<i>Pseudomonas</i> sp.	5'- GAC GGG TGA GTA ATG CCT A-3' 5'- CACTGG TGT TCC TTC CTA TA-3'	54°C
<i>P. aeruginosa</i>	5'-GGG GGA TCT TCG GAC CTC A-3' 5'-TCC TTA GAG TGC CCA CCC G-3'	58°C

Tabela 2. Detecção de bactérias entéricas, pseudomonados e leveduras em pacientes edêntulos, pacientes com gengivite ou periodontite. Resultados obtidos por cultura.

Microrganismo	Pacientes			
	EP ¹ N (%)	GP ² N (%)	PP ³ N(%)	PHS ⁴ N (%)
<i>Acinetobacter bamannii</i>	3 (7,32)	3 (3,37)	4 (5,71)	0 (0,0)
<i>Citrobacter freundii</i>	2 (4,88)	3 (3,37)	1 (1,43)	1 (2,0)
<i>Escherichia coli</i>	3 (7,32)	1 (1,12)	2 (2,86)	0 (0,0)
<i>Enterobacter cloacae</i>	6 (14,63)	6 (6,74)	5 (7,14)	1 (2,0)
<i>Enterobacter intermedius</i>	3 (7,32)	1 (1,12)	2 (2,86)	0 (0,0)
<i>Enterobacter sakazakii</i>	4 (9,76)	2 (2,25)	2 (2,86)	1 (2,0)
<i>Enterococcus</i> sp.	3 (7,32)	6 (6,74)	5 (7,14)	4 (8,0)
<i>Enterococcus faecalis</i>	5 (12,2)	13 (14,61)	8 (11,43)	5 (10,0)
<i>Enterococcus faecium</i>	3 (7,32)	2 (2,25)	3(4,29)	0 (0,0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	6 (14,63)	2 (2,25)	2 (2,86)	1 (2,0)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2 (4,88)	1 (1,12)	0 (0,0)	0 (0,0)
<i>Morganella morganii</i>	5 (12,2)	7 (7,87)	4 (5,71)	1 (2,0)
<i>Pantoea agglomerans</i>	3 (7,32)	2 (2,25)	2 (2,86)	0 (0,0)
<i>Proteus mirabilis</i>	1 (2,44)	1 (1,12)	3(4,29)	0 (0,0)
<i>Proteus vulgaris</i>	2 (4,88)	3 (3,37)	2 (2,86)	0 (0,0)
<i>Providencia alcalifaciens</i>	3 (7,32)	2 (2,25)	1 (1,43)	0 (0,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4 (9,76)	5 (5,62)	5 (7,14)	1 (2,0)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 (2,44)	0 (0,0)	1 (1,43)	0 (0,0)
<i>Serratia liquefaciens</i>	2 (4,88)	4(4,49)	3(4,29)	0 (0,0)
<i>Serratia</i> sp.	4 (9,76)	3 (3,37)	2(2,86)	0 (0,0)
Total de bactérias alvo*	31 (75,61)	23 (25,84)	21 (30,0)	9 (18,0)
<i>Candida albicans</i>	23 (56,1)	13 (14,61)	11 (15,71)	7 (14,0)
<i>C. glabrata</i>	7 (17,07)	3 (3,37)	2 (2,86)	0 (0,0)
<i>C. tropicalis</i>	4 (9,76)	1(1,12)	1 (1,43)	1 (2,0)
<i>C. parapsilosis</i>	3 (7,32)	1 (1,12)	0 (0,0)	1 (2,0)
<i>C. krusei</i>	3 (7,32)	1(7,69)	1 (0,0)	0 (0,0)
Total leveduras*	29 (70,73)	14 (15,73)	13 (18,57)	7 (14,0)

¹Pacientes edêntulos usuários de prótese total N=41

²Pacientes com gengivite N=89

³Pacientes com periodontite N=70

⁴Pacientes periodontalmente saudáveis N=50

* Alguns pacientes apresentaram mais do que uma espécie de bactéria entérica ou levedura concomitantemente.

Tabela 3. Detecção das bactérias alvo por PCR.

Microrganismo	Pacientes			
	EP ¹ N (%)	GP ² N (%)	PP ³ N (%)	PHS ⁴ N (%)
<i>Enterobacteriaceae</i>	32 (78,05)	33 (37,08)	31 (44,29)	15 (30,0)
<i>Enterococcus</i> sp.	4 (9,76)	9 (10,11)	12 (17,14)	4 (8,0)
<i>E. faecalis</i>	7 (17,03)	19 (21,35)	14 (20,0)	7 (14,0)
<i>E. faecium</i>	5 (12,2)	5 (5,62)	3 (4,29)	1 (2,0)
<i>Pseudomonas</i> sp.	9 (21,95)	9 (10,11)	8 (11,43)	1 (2,0)
<i>P. aeruginosa</i>	7 (17,07)	7 (7,87)	8 (11,43)	1 (2,0)
Total bactéria alvo*	36 (87,8)	34 (38,2)	45 (64,29)	18 (36,0)

¹Pacientes edêntulos usuários de prótese total N=41

²Pacientes com gengivite N=89

³Pacientes com periodontite N=70

⁴Pacientes periodontalmente saudáveis N=50

* Alguns pacientes apresentaram mais do que uma espécie de bactéria entérica ou levedura concomitantemente.

Tabela 4. Fatores associados com a presença de bactérias alvo e fungos na cavidade oral de edêntulos, pacientes com gengivite e periodontite.

Grupo experimental	N (%)	P
Pacientes edêntulos (n=41)		
1) Higiene da prótese		
Satisfatório N= 16	9 (56.25)	
Insatisfatório N=25	22 (88.0)	P= 0,024*
2) Idade da prótese		
5 anos ≤ N= 11	3(27.27)	
idade 5-10 anos N= 20	18 (90.0)	P<0,01*
idade > 10 anos N= 10	10 (100.0)	
3) Candidose N= 13	12 (92.31)	P= 0,041*
Pacientes com gengivite e periodontite (N= 159)		
1) Índice de placa		
X ≤ 50% N= 58	10(17.24)	
X > 50% N= 101	34(33.66)	P= 0,046*
2) Uso prévio de antimicrobiano		
Sim N= 17	11 (64.71)	
Não N= 142	33 (23.24)	P= 0,021*

* Estatisticamente significante

**Resistência a antimicrobianos de microrganismos isolados da cavidade oral
de pacientes com diferentes condições de higiene oral e usuários de prótese
total**

Esse estudo foi desenvolvido parcialmente com recursos da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo- FAPESP (Proc. No. 07/54851-0)

* Este artigo foi escrito de acordo com as normas do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* (Anexo A).

3.1 Resumo

Objetivo. Este estudo avaliou a resistência a antimicrobianos de microorganismos isolados de pacientes usando próteses totais, pacientes com gengivite, pacientes com periodontite, e indivíduos peridontalmente saudáveis. Trezentos e quatro aeróbios ou anaeróbios facultativos e 270 anaeróbios estritos foram testados. As concentrações inibitórias mínimas da droga foram avaliadas pelo método de diluição em ágar. O ágar Mueller-Hinton foi usado para aeróbios ou anaeróbios facultativos, enquanto que ágar Wilkins Chalgren suplementado com hemina, menadiona e sangue de cavalo e foi empregado para os anaeróbios estritos. Um nível significativo de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos foi observado para aeróbios ou anaeróbios facultativos, com exceção dos carbapanêmicos, rifampicina e ciprofloxacina, enquanto anaeróbios estritos evidenciaram resistência especialmente para β -lactâmicos, eritromicina e tetraciclina. O metronidazol foi altamente eficaz frente a anaeróbios GRAM-negativos, enquanto clindamicina, imepenem, meropenem e rifampicina foram altamente eficazes contra todos os anaeróbios estritos.

Palavras-chave: Resistência Microbiana a Medicamentos, Agentes Antibacterianos, Reação em Cadeia da Polimerase

3.2 *Abstract*

Objective. This study evaluated the resistance to antimicrobials of microorganisms isolated from patients wearing complete dentures, gingivitis, periodontitis patients, and periodontally health subjects. Three hundred four aerobes or facultative anaerobes, as well 270 strict anaerobes were tested. The minimal inhibitory concentrations of the drugs were evaluated by mean the agar dilution method. The Mueller-Hinton agar was used for facultative anaerobes and aerobes, while Wilkins-Chalgren agar supplemented with hemin, menadione and horse blood was employed for the strict anaerobes. A significant level of resistance to most antimicrobial agents was observed for aerobes and facultative anaerobes, excepting ciprofloxacin and rifampicin, while strict anaerobes evidenced resistance especially to β -lactams, erythromycin, and tetracycline. Metronidazole was highly effective against GRAM-negative anaerobes and clindamycin, imepenem, meropenem and rifampicin were highly effective against all strict anaerobes and most aerobes and facultative anaerobes.

Key-words: Drug Resistance Microbial, Anti-Bacterial Agents, Polymerase Chain Reaction

3.3 Introdução

A cavidade oral pode agir como um reservatório de microrganismos superinfectantes comumente associados a infecções oportunistas e sistêmicas (1,2) especialmente em idosos que fazem uso próteses totais (3). Além disso, a maioria desses grupos é exógena para a cavidade oral e do uso, ou uso indevido, de antimicrobianos (4,5), bem como a difusão de genes de resistência entre os membros da microbiota bucal. Padrões pobres de higiene podem facilitar a colonização da boca por bactérias superinfectantes, especialmente a partir de microbiota entérica (6).

Infecções orais, tais como mucosite por prótese, endodôntica, periodontal e periapical, resultam da perda de equilíbrio entre a resposta imune e fatores de virulência da microbiota (7,8). Embora procedimentos locais e cirúrgicos, como a drenagem, de infecções orais continuam a ser as bases do tratamento, os agentes antimicrobianos podem atuar como adjuvantes na terapêutica, especialmente em locais anatômicos onde procedimentos cirúrgicos ou locais não podem ser alcançados. A grande maioria destes processos infecciosos são um misto de aeróbio-anaeróbio, com predomínio dos anaeróbios estritos (9).

Nos países em desenvolvimento, a determinação dos padrões de resistência aos antimicrobianos para anaeróbios estritos não constitui um procedimento rotineiro (10), o que obriga o clínico a se basear, na prescrição desses medicamentos, na literatura européia, japonesa e norte-americana, onde hábitos de automedicação não são amplamente disseminados na população. Além disso, o mau uso de antibióticos e outras drogas geralmente levam à seleção de microrganismos resistentes e o resultado do tratamento clínico pode ser ruim (9).

A associação entre as condições periodontais (11,12) ou a presença de prótese total (3) e da ocorrência de patógenos oportunistas e superinfectantes foram estabelecidos. No entanto,

não são disponíveis dados sobre a susceptibilidade a antimicrobianos de microorganismos isolados de drogas de diferentes condições periodontais e dispositivos protéticos. Além desse aspecto, em uma pesquisa recente nos E.U.A., Goldstein et al. (13) evidenciaram que apesar de cultura para anaeróbios ser rotina nos laboratórios clínicos americanos, a identificação de isolados microbianos e a realização de testes de susceptibilidade a antimicrobianos necessitam de melhorias consideráveis.

3.4 Proposição

O objetivo deste estudo foi avaliar a susceptibilidade de microrganismos isolados a partir de vários sítios anatômicos da cavidade bucal de pacientes usando próteses totais, ou portadores de gengivite ou periodontite crônica e pacientes periodontalmente saudáveis a antimicrobianos comumente utilizados para o tratamento de infecções de cabeça e pescoço.

3.5 Materiais e Métodos

Pacientes

A população deste estudo consistiu de 250 pacientes, compreendendo 84 homens e 166 mulheres, com idade entre 16-60 anos (idade média de 43,03 anos), atendidos dentro de um período de 10 anos na Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista-UNESP, Brasil, a partir de fevereiro de 1998 a março de 2008. Quarenta e um pacientes usavam próteses totais, enquanto que 89 apresentavam-se com gengivite, 70 eram pacientes com periodontite crônica e 50 indivíduos periodontalmente saudáveis, de acordo com os critérios descritos por Tonetti & Claffey (14). Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido para a realização do trabalho, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Paulista-UNESP (Protocolos 2002/01034).

Os critérios de exclusão foram história de automedicação, diabetes, doenças auto-imunes e outras patologias sistêmicas.

Amostras clínicas, isolamento e identificação microbiana.

Antes de exames clínicos, procedia-se a coleta de saliva da mucosa oral, língua, e biofilme supragengival e subgengival de indivíduos saudáveis periodontalmente, pacientes com gengivite e periodontite.

Amostras clínicas foram retiradas de três sítios periodontais mais afetados em cada paciente (5) por meio de cones de papel absorvente (5), enquanto o biofilme supragengival foi removido com auxílio de curetas periodontais. Amostras clínicas foram transferidas para meio de transporte VMGA III(15). As amostras da mucosa bucal foram obtidas por meio de zaragatoa estéril, a qual foi transferida para a 3 ml de VMGA III. No laboratório, as amostras

clínicas eram submetidas a diluições seriadas em VMG I e inoculadas em meios seletivos e não seletivos.

Saliva foi coletada usando dispositivos Salivette (Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Alemanha), que foram centrifugados, a 5000 xg, durante 2 minutos, e, a seguir, a saliva era diluída em VMG I e inoculados em meios de cultura seletivos e não seletivos. Os pacientes foram orientados a não beber, comer ou limpar suas bocas 1h antes da coleta saliva. Amostras clínicas foram processados dentro de 2 horas.

As amostras clínicas de pacientes desdentados foram obtidas do palato, dorso da língua e da superfície dos dispositivos protéticos, tendo sido coletadas através de zaragatoa alginatada (3), que também foram transferidas para VMGA III. As amostras de saliva desses pacientes também foram coletadas segundo metodologia descrita acima.

Espécimes clínicos foram inoculados em água peptonada e caldo etil violeta azida (caldo EVA, Difco) e incubadas em temperatura ambiente e 37°C, por 3-7 dias. Então, a partir de crescimento bacteriano observado em água peptonada, alíquotas de 0,1 ml foram transferidas para ágar eosina azul metileno, ágar SS, ágar MacConkey e ágar verde brilhante. A partir de tubos contendo caldo EVA, 0,1 ml foi transferida para o ágar bile esculina. As placas ágar foram incubadas em aerobiose, a 37°C, por 48 h (5). Espécies bacterianas foram identificadas de acordo com as suas características coloniais, coloração de GRAM, um crescimento de 10% de cloreto de sódio, a produção de gás da glicose, e testes bioquímicos utilizando kits comerciais (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França).

Das diluições seriadas em meio VMG I, alíquotas foram também inoculadas em ágar Fastidious Anaerobe, suplementado com extrato de levedura (0,5%), hemina (5 µg/mL), e menadiona (1 µg/mL), para o isolamento de anaeróbios estritos de cultivo exigente; ágar cristal violeta eritromicina (ágar CVE), para isolamento de fusobactérias orais, ágar de tripticaseína de soja bacitracina e vancomicina (ágar TSBV), para *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans, ágar FAA acrescido de vancomicina (0,5 mg/L) e canamicina (0,016 mg/L) para isolamento de cocos e bacilos GRAM-positivos anaeróbios, e incubados em anaerobiose (90% N₂ + 10% de CO₂), a 37°C, por 14, 4, 3 e 14 dias, respectivamente (16).

Os isolados foram submetidos a análises morfofocelular e morfocolonial, teste respiratório e teste da catalase. A identificação com o gênero e nível de espécie foi realizada por kits comerciais (bioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França). Entretanto, alguns isolados dos gêneros *Campylobacter*, *Eikenella*, *Porphyromonas* e *Prevotella* que não foram corretamente identificados por testes convencionais tiveram a sua identificação confirmada através da amplificação do seu DNA e PCR usando oligonucleotídeos específicos condições descritas por Ashimoto et al. (17).

Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Todos os isolados de aeróbios, anaeróbios facultativos (N = 304), microaerófilos e anaeróbios estritos (N = 270) foram analisados quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos pelo teste de diluição em ágar como método recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, antigamente conhecido como o NCCLS, 2003 e 2004; documento M7-A6 para a realização de ensaios envolvendo aeróbios e aprovada norma M11-A6 anaeróbios de cultivo exigente). Os testes foram realizados pelo método de diluição em ágar. Ágar Wilkins-Chalgren complementado com sangue de cavalo, hemina (5 mg / mL) e menadiona (1 mg / mL) foi utilizado para anaeróbios estritos e Ágar Mueller-Hinton foi usado para aeróbios facultativos e anaeróbios.

Resumidamente cinco colônias de cada linhagem bacteriana foram inoculadas em 2 ml de caldo estéril Mueller-Hinton ou infusão em caldo de cérebro coração suplementado com hemina, menadiona e extrato de levedura e incubado a 37 ° C durante 12-48 h. A turbidez foi ajustada para corresponder ao padrão de 0,5 da escala de McFarland. Os inóculos bacterianos foram padronizados em 10⁵ células e transferidos para as placas de Petri contendo os

antimicrobianos e placas de controle (sem drogas), utilizando um replicador Steer's (CEFAR Ltda, São Paulo, SP, Brasil). A concentração inibitória mínima (MIC) foi definida como a menor concentração da droga capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano.

Um total de 16 antibióticos ou drogas associações foram testadas. Os antibióticos foram obtidos a partir da Oxoid (Basingstoke, Inglaterra) e para os anaeróbios facultativos e aeróbios constou das seguintes: amicacina, amoxicilina, amoxacillin/ácido clavulânico, cefoxitina, cefalotina, cloranfenicol, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina, imepenem, meropenem, ácido nalidíxico, rifampicina, e tetraciclina. Para os anaeróbios estritos, amoxicilina, amoxacillin/ácido clavulânico, azitromicina, cefoxitina, cefalotina, clindamicina, doxiciclina, eritromicina, imepenem, meropenem, metronidazol, rifampicina, tetraciclina foram testadas. Antimicrobianos foram testados numa concentração em duas vezes superior à concentração séries variando de 0,06 µg/mL para 512 µg/mL. Após a incubação, a organismos foram classificados como sensíveis (S) e resistente (R), de acordo com orientações da CLSI.

F. nucleatum ATCC 10953 e ATCC 25586, *E. lentum* ATCC 43055 e ATCC 23745 e *B. fragilis* foram utilizadas como cepas de referência para o controle de qualidade nos ensaios envolvendo anaeróbios estritos, enquanto que *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, ATCC 29212 e *E. faecalis* foram utilizadas em experimentos envolvendo os anaeróbios facultativos. As placas teste e as placas controle foram incubadas por via anaeróbia (90% N₂ + 10% CO₂) ou aeróbia a 37 ° C, por 48 horas.

Detecção de β-lactamases

Os isolados resistentes aos β-lactâmicos foram também testados para avaliar a presença de atividade de β-lactamases. Utilizaram-se os métodos da cefalosporina cromogênica (18) e o método biológico (10,19). Os dois métodos foram realizados em função

da incapacidade do método da cefalosporina cromogênica em detectar alguns tipos de β -lactamases produzidas por alguns anaeróbios estritos (18,19).

No método da cefalosporina cromogênica empregaram-se os discos de cefinase, segundo as realizado de acordo com as instruções do fabricante (Calbiochem, San Diego, Califórnia, E.U.A.). Resumidamente, discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro, impregnados com nitrocefina foram umedecidos com NaCl 0,85% e vários fragmentos de colônias de microrganismos resistentes eram transferidos para a superfície dos discos. Após 10-60 min, discos foram examinados para o aparecimento de uma coloração rosa-vermelha característica da degradação do nitrocefina pela ação da β -lactamase bacteriana.

No método biológico, 20 μ L das culturas dos isolados resistentes eram plaqueados na superfície do ágar Wilkins Chalgren contendo 0,5 μ g/mL do β -lactâmico para o qual o microrganismo testado mostrou-se resistente. Estas placas foram incubadas em anaerobiose ou então aerobiose, a 37 ° C, por 48 h. Após este período de incubação, as culturas foram expostas ao vapor de clorofórmio por 20 min. e, em seguida, cobertas com 3 mL de meio semi-sólido infusão cérebro coração (0,7% de ágar), previamente inoculadas com 10⁶ células de *Streptococcus pyogenes* FOA-94F14 sensível a todos os β -lactâmicos em uma concentração menor ou igual a 0,06 mg/mL.

As placas de Petri foram então incubadas em microaerofilia, por 24 horas, a 37 ° C. Após a incubação, avaliava-se a presença ou ausência de crescimento da cepa teste de estreptococo, também denominada de cepa reveladora. A presença deste halo de crescimento era o indicativo de degradação da droga β -lactâmica. *Bacteroides fragilis* ATCC 43858 foi utilizado como controle positivo da produção de β -lactamases.

Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de software “Statistical Package for the Social Sciences” (SPSS Inè v.13, Chicago, IL, E.U.A.). Diferenças

significativas na frequência de resistência às drogas antimicrobianas foram avaliadas utilizando o teste Mann-Whitney, Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher. Qualquer diferença de $P < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa

3.6 Resultados

Para aeróbios e anaeróbios facultativos, níveis significativos de resistência foram observados para todos os β -lactâmicos, com exceção do meropenem e o imipenem, que apresentaram 1,64% e 2,3% de resistência, respectivamente. Entre os β -lactâmicos, resistência mais proeminente foi observada para amoxicilina e cefalotina, atingindo 44,41% e 33,22% dos aeróbios e anaeróbios facultativos testados, respectivamente (Tabela 1).

Para os anaeróbios estritos, os níveis de resistência a β -lactâmicos foram significativamente reduzidos em comparação com os microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, atingindo 11,11% para cefalotina. Não foram observados isolados resistentes aos carbapenêmicos. Entre esses anoxibiontes, 11,85% dos isolados foram produtores de β -lactamases (Tabela 2), especialmente os isolados dos gêneros *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides*. Entre esses anaeróbios estritos resistentes aos β -lactâmicos, 74,42% foram produtores de β -lactamase, enquanto que 51,74% de todos os isolados anaeróbios facultativos resistentes a pelo menos uma dessas drogas também produziram essas enzimas.

A associação amoxicilina/ácido clavulânico foi eficaz contra todos os anaeróbios estritos, mas os aeróbios e anaeróbios facultativos, particularmente os entéricos, apresentaram graus variáveis de resistência. Resistência a essa associação foi detectada em 28,29% dos aeróbios/anaeróbios facultativos. A produção de enzimas hidrolíticas parece ser o principal mecanismo de resistência a β -lactâmicos, exceto nos enterococos e pseudomonados, onde β -lactamases não foram detectadas (Tabelas 1 e 2).

Níveis variáveis de resistência aos aminoglicosídeos, cloranfenicol, a doxiciclina, gentamicina, ácido nalidíxico, rifampicina e tetraciclina também foram observados em aeróbios e anaeróbios facultativos (Tabela 3). A característica mais notável foi a significativa

resistência dos enterococos à amicacina e, em menor extensão, à tetraciclina, bem como a resistência de *P. aeruginosa* à doxiciclina, tetraciclina e ácido nalidíxico. Enterococos foram as mais resistentes cocos GRAM-positivos, enquanto os estreptococos e os mais suscetíveis.

Em relação aos anaeróbios estritos e microaerófilos, a suscetibilidade a maior parte dos medicamentos ensaiado foi significativa. Todos os isolados GRAM-negativos foram altamente susceptíveis ao metronidazol e apenas dois bastonetes anaeróbios GRAM-positivos foram resistentes. Além disso, o nível de resistência à clindamicina e rifampicina foram reduzidos. A Tabela 4 evidencia que apenas tetraciclina e eritromicina apresentaram níveis mais elevados de resistência nos anaeróbios e microaerófilos testados.

3.7 Discussão

Embora bactérias entéricas e pseudomonados vindo sendo associadas a diversas infecções orais e extra-orais e alguns estudos têm evidenciado que a cavidade oral pode atuar como reservatório desses microrganismos e os seus genes de resistência antimicrobiana (1,11), a maioria dos processos infecciosos orais está associada aos anaeróbios estritos, especialmente às periodontopatias, infecções endodônticas e infecções periapicais, e outras infecções ósseas de origem odontogênica (9,20). No entanto, há poucos centros no Brasil que realizam testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para os anaeróbios estritos.

Esta condição cria problemas sérios, uma vez que existem poucas informações disponíveis sobre os padrões de susceptibilidade e disseminação de genes de resistência relativos à microbiota bucal associada às infecções de cabeça e pescoço em países em desenvolvimento (21). Esses países têm fatores socioeconômicos e comportamentais que favorecem a resistência bacteriana, tais como a auto-medicação e uso indevido de antimicrobianos (19,22;23). Como agravante, a resistência dos microrganismos anaeróbios estritos e facultativos expandiu-se consideravelmente (19,20,24,25), o que tornou os hábitos de prescrição tradicionais, realizados na ausência de exames laboratoriais, temerários, particularmente em processos infecciosos graves, como as celulites e osteomielites. Além disso, os padrões de susceptibilidade aos antimicrobianos entre os aeróbios e anaeróbios facultativos têm evidenciado a presença de muitos microrganismos multirresistentes, tanto em isolados de microbiota residente e exógena, do meio ambiente (26,27), o que limita o uso empírico de drogas antimicrobianas.

A utilização de antimicrobianos pode constituir um importante adjuvante no tratamento de infecções odontogênicas (9,19,28). Contudo, desde que testes de susceptibilidade não são realizados para os principais patógenos associados a essas infecções,

fenômeno agravado pelo pouco salutar hábito de automedicação do povo brasileiro (19;23), tem-se uma progressiva limitação da eficácia do tratamento medicamentoso e faz com que o ato de prescrever se torne uma tarefa difícil, porque modifica os padrões locais de susceptibilidade às drogas.

Entretanto, os dados apresentados no presente estudo, mostram que a resistência aos antimicrobianos, particularmente para os anaeróbios estritos, foi significativamente menor do que a observada na literatura (1,21,22), especialmente quando comparado com microrganismos orais e não-orais isolados de infecções hospitalares (29).

Agentes β -lactâmicos como as penicilinas, as cefalosporinas, os carbapenêmicos, estão entre os antibióticos mais prescritos em todo o mundo. Os resultados do presente inquérito confirmam que os carbapenêmicos são os únicos β -lactâmicos capazes de exercer atividade inibitória sobre a maioria dos microrganismos entéricos (30), estafilococos (31) e anaeróbios orais (9,29).

Em patógenos GRAM-negativos, β -lactamases continuam a ser o fator mais importante para resistência a β -lactâmicos, e sua crescente prevalência, bem como sua evolução alarmante, parecem estar diretamente ligadas ao uso clínico abusivo ou não dessas drogas (32-34). Várias famílias de β -lactamases tem sido identificadas, mas testes fenotípicos não podem diferenciá-las, um fato que cria problemas para a vigilância ambulatorial e estudos de epidemiologia (35).

Opções terapêuticas para as infecções causadas por organismos GRAM-negativos expressando β -lactamases são limitados, pois esses organismos são geralmente resistentes a todos os β -lactâmicos, com exceção de algumas cefalosporinas e os carbapenêmicos, como também observado na Tabela 1 e, em um menor grau, na Tabela 2. Estes organismos são uma das principais preocupações em infecções nosocomiais e, portanto, deveriam ser monitorados em estudos de vigilância epidemiológica, o que é quase completamente desconhecido em

odontologia de âmbito hospitalar.

Em anaeróbios GRAM-negativos, a maioria das β -lactamases são ativas em penicilinas e cefalosporinas (24), como observado nas Tabelas 1 e 2. Além disso, uma vez que alguns isolados de *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e os membros da família *Enterobacteriaceae* foram resistentes à amoxicilina, cefoxitina e cefalotina, o uso de cefalosporinas, em substituição de penicilinas, no tratamento de infecções mistas está comprometido, especialmente em pacientes com história anterior de uso de penicilinas ou outras drogas dessa classe (19). Por outro lado, a eficiência do imipenem e meropenem sobre estes microrganismos salienta a necessidade de deixar estes carbapenêmicos para uso exclusivo em infecções graves, evitando a disseminação da resistência.

No entanto, a produção de β -lactamases não constitui o único mecanismo de resistência aos β -lactâmicos, sendo que a produção de proteínas de ligação à penicilina com baixa afinidade a esses fármacos (36) e a impermeabilidade da membrana externa de bactérias GRAM-negativas para estas drogas também têm sido descritas (36). No presente estudo, a maioria dos anaeróbios estritos resistentes aos β -lactâmicos foram produtores de β -lactamases, o que está de acordo com a literatura (32, 34, 37), enquanto que, para aeróbios e anaeróbios facultativos, a produção de β -lactamases parece estar associada a outros mecanismos de resistência (38).

Alguns isolados que são resistentes aos β -lactâmicos não provaram ser produtores de β -lactamase pela metodologia aqui empregada, sugerindo que essas bactérias sejam produtoras de β -lactamases não exportáveis, como descrito anteriormente para algumas bactérias GRAM-negativas (32), ou a presença de outros mecanismos de resistência, como a alteração da estrutura das proteínas de ligação de penicilina reduzindo a afinidade para os β -lactâmicos, ou o método da sensibilidade, não permitem a detecção destas enzimas (19).

Neste sentido, enterococos, em geral, e *E. faecium*, em particular, são intrinsecamente mais resistentes à penicilina e amoxicilina do que os outros estreptococos e cocos relacionados. Resistência à ampicilina e amoxicilina em *E. faecium* se dá devido a expressão da classe B de proteínas de ligação à penicilina com baixa afinidade (PLP). Os primeiros estudos sugeriram que níveis mais elevados de resistência à essas drogas, em *E. faecium*, eram atingidos pelo aumento dos níveis de expressão da PLP 5 (39). No entanto, níveis elevados de resistência em isolados clínicos são apenas raramente associados com níveis aumentados da expressão dessas proteínas (40). Entretanto, mutações capazes de conferir elevados níveis de resistência aos β -lactâmicos foram descritas nos genes que codificam para essas PLPs (36).

No tratamento de pacientes alérgicos a β -lactâmicos ou com histórias clínicas de má utilização destes fármacos, macrolídeos e clindamicina são freqüentemente recomendados como adjuvantes. No entanto, a tabela 4 evidencia ampla resistência à eritromicina, o macrolídeo tradicionalmente mais utilizado. Essa resistência se mostrou bastante elevada nos bastonetes anaeróbios GRAM-negativos dos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas* e fusobactérias, bem como cocos anaeróbios GRAM-positivos do gênero *Peptostreptococcus*. A resistência das fusobactérias e *Peptostreptococcus* spp. à eritromicina é bem documentada (9,41) e, tal como também acontece com os outros anaeróbios, essa resistência não ocorre com os novos macrolídeos, como azitromicina (9).

A clindamicina muitas vezes se mostra útil no tratamento de infecções anaeróbios mistas e infecções ósseas, e a maior parte dos anaeróbios GRAM-negativos e GRAM-positivos se mostrou altamente susceptível a esse fármaco, como também relatado na literatura (9,31,42), embora tenha sido detectada alguma resistência (25,43). A eficácia da clindamicina foi superior ao observado ao metronidazol para alguns grupos microbianos anaeróbios, particularmente cocos GRAM-positivos.

Esse fenômeno se deu visto que o metronidazol é particularmente ativo sobre anaeróbios GRAM-negativos (9,26,31), ao passo que níveis variáveis de resistência vêm sendo encontrados em microrganismos GRAM-positivos, especialmente dos gêneros *Peptostreptococcus*, como também evidenciado no presente estudo, e *Clostridium*. Além disso, o metronidazol é pouco eficaz sobre microaerófilos ou anaeróbios facultativos bucais, como *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, e *E. corrodens*, mas é possível que a conversão espontânea dessa droga para sua forma ativa, em condições redox negativas, como ocorre nos testes de susceptibilidade em que os microrganismos são incubados em anaerobiose, faça com que parcela desses microrganismos facultativos ou microaerófilos se mostre sensível nos testes *in vitro*. Como a maioria das infecções de cabeça e pescoço é anaeróbia e polimicrobiana, a ação do metronidazol sobre os anaeróbios obrigatórios por vezes leva a uma redução nas populações de microrganismos facultativos que deles dependem.

As tabelas 3 e 4 evidenciam que a resistência à tetraciclina também foi frequentemente detectada entre anaeróbios estritos, aeróbios e anaeróbios facultativos. Este fenômeno pode estar relacionado à sua ampla utilização na medicina, odontologia e veterinária, variando desde o controle e tratamento de acne, periodontite avançada e como promotores de crescimento em granjas de aves e suínos (44). Os mais disseminados determinantes genéticos da resistência à tetraciclina são representados pelos genes *tet*, os quais podem ser agrupados em genes que codificam proteínas de efluxo, genes associados às proteínas de proteção e proteínas capazes de inativar as moléculas do fármaco (45).

A ação desses determinantes de resistência por vezes se mostra específica a uma droga do grupo das tetraciclinas, mas, em outros casos, pode ser extensiva à família de fármacos como um todo. Os resultados apresentados nas tabelas 3 e 4 não apóiam o uso de doxiciclina ou tetraciclina em infecções fatais, sendo que alguma resistência cruzada entre essas drogas foi observada.

Tem sido sugerido que a resistência aos β -lactâmicos, eritromicina e tetraciclina podem estar geneticamente interligadas, especialmente em anaeróbios estritos GRAM-negativos (9). Entretanto, os dados apresentados nas tabelas 2 e 4 não suportam essa afirmação, uma vez que alguns isolados foram resistentes à eritromicina e tetraciclina não mostraram qualquer resistência aos β -lactâmicos testados. Dentre os principais microrganismos associados à resistência à tetraciclina, destacam-se os estreptococos (44), que se mostraram sensíveis à grande maioria das demais drogas testadas no presente estudo.

Em um estudo anterior, o nosso grupo evidenciou que a ocorrência de microrganismos entéricos e pseudomonados foi aumentada pela supressão parcial da microbiota anaeróbia oral, como também relatado por Helovu et al. (47) e Aas et al. (12). Os dados disponíveis mostram que, em nível de espécies, *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* foram as mais beneficiadas com o uso de antimicrobianos pelos pacientes ($P = 0,032$ e $P = 0,028$), aumentando sua prevalência significativamente em indivíduos que utilizaram esses fármacos. Com base nos resultados do presente estudo, o papel da resistência antimicrobiana na ocorrência dessas bactérias oportunistas é realçado e a maioria dos enterococos e pseudomonados multirresistentes foram isolados de pacientes submetidos a tratamento antimicrobiano nos três meses antes da coleta dos espécimes clínicos.

Dos 17 pacientes que declararam a utilização de antimicrobianos nos três meses anteriores à coleta das amostras, 13 utilizaram β -lactâmicos, o que poderia interferir com os altos níveis de resistência bacteriana a esta classe de drogas, conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2. Apesar da pequena participação no total da população microbiana presente no sulco gengival, biofilme supragengival, saliva e outros sítios da cavidade oral, a ocorrência desses patógenos entéricos e pseudomonados não deveria ser negligenciada uma vez que os mesmos podem atuar como reservatórios de genes de resistência aos antimicrobianos e importantes agentes de infecções nosocomiais (1).

3.8 Conclusões

De ante do exposto pode-se concluir que:

- A maioria dos isolados aeróbios ou anaeróbios facultativos foi resistente à amoxicilina e outros β -lactâmicos empregados freqüentemente na odontologia;
- Os anaeróbios estritos são muitos mais sensíveis a esses fármacos e os resistentes aos β -lactâmicos são sensíveis à associação amoxicilina/ácido clavulânico;
- O principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos é a produção de enzimas capazes de degrada-los, mas existem exceções, como os gêneros *Enterococcus* e *Pseudomonas*;
- Drogas como azitromicina, metronidazol e clindamicina também seriam úteis para o tratamento de infecções odontogênicas;
- No entanto, quando sinais de infecções anaeróbias estiverem ausentes, ou o paciente possui histórico de utilização de antimicrobianos de amplo espectro de ação, ou tratamento prévio, quinolonas, como a ciprofloxacina, poderiam ser utilizadas no tratamento.
- A maioria dos microorganismos resistentes aos β -lactâmicos não é sensível à associação de amoxicilina com ácido clavulânico;
- Grande parte dos isolados aeróbios ou anaeróbios facultativos foi resistente à amoxicilina e os anaeróbios estritos são sensíveis à associação amoxicilina/ácido clavulânico.

Agradecimentos

Este estudo foi patrocinado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) Proc. No. 07/54851-0

3.9 Referências

1. Gonçalves, M.O.; Coutinho-Filho, W.P.; Pimenta, F.P.; Pereira, G.A.; Pereira, J.A.A.; Mattos-Guaraldi, A.L.; Hirata Jr, R. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett Appl Microbiol.*, 44:488-94, 2007.
2. Paju, S.; Scannapieco, F. A. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Diseases.*, 13:508-512, 2007.
3. Daniluk, T.; Fiedoruk, K.; Ściepuk, M.; Zaremba, M.L.; Rozkiewicz, D.; Cylwik-Rokicka, D.; Tokajuk, G.; Kędra, B.A.; Anielska, I.; Stokowska, W.; Górská, M.; Kędra, B.R. Aerobic bacteria in the oral cavity of patients with removable dentures. *Adv Med Sci.*, 51(Suppl. 1): 86-90, 2006.
4. Sixou, M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral Dis.*, 9 (suppl. 1), 54-62, 2003.
5. Gaetti-Jardim Jr, E.; Nakano, V.; Wahasugui, T.C.; Cabral, F.C.; Gamba, R.; Avila-Campos, M.J. Occurrence of yeasts, enterococci and other enteric bacteria in subgingival biofilm of hiv-positive patients with chronic gingivitis and necrotizing periodontitis. *Braz. J. Microbiol.*, 39:257-261, 2008.
6. Slots, J.; Ting, M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol.*, 28 (1), 106-76, 2000.
7. Olsen I, Dahlén G. Salient virulence factors in anaerobic bacteria, with emphasis on their importance in endodontic infections. *Endod Topics.*, 9:15-26, 2004.
8. Feng, Z.; Weinberg, A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. *Periodontology.*, 40 (1): 50-76, 2006.
9. Kuriyama, T.; Williams, D.W.; Yanagisawa, M.; Iwahara, K.; Shimizu, C.; Nakagawa, K.; Yamamoto, E.; Karasawa, T. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from

patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol.*, 22: 285-288, 2007.

10. Paula, M.O.; Avila-Campos, M.J.; Gaetti-Jardim Jr, E. Plasmid profile in oral *Fusobacterium nucleatum* from humans and *Cebus apella* monkeys. *Rev Inst Med Trop São Paulo.*, 45:5-9, 2003.

11. Barbosa, F.C.B.; Mayer, M.P.A.; Saba-Chujfi, E.; Cai, S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.*, 16: 306-310, 2001.

12. Aas, J.A.; Barbuto, S.M.; Alpagot, T.; Olsen, I.; Dewhirst, F.E.; Paster, B.J. (2007). Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients. *J. Clin. Periodontol.*, 34 (3), 189-195.

13. Goldstein, E.J.C.; Citron, D.M.; Goldman, P.J.; Goldman, R. National hospital survey of anaerobic culture and susceptibility methods: III. *Anaerobe*. Doi:10.1016/j.anaerobe.2008.01.001. (In press).

14. Tonetti, M.S.; Claffey, N. Advances in the progression of periodontitis and proposal of definitions of a periodontitis case and disease progression for use in risk factor research. *J Clin Periodontol.*, 32:210-3, 2005.

15. Möller, Å.J.R. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift.*, 74:1-380, 1996.

16. Gomes, B.P.F.A.; Pinheiro, E.T.; Gadê, C.R.; Sousa, E.L.R.; Ferraz, C.C.R.; Zaia, A.A.; Teixeira, F.B.; Souza-Filho, F.J. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.*; 19:71-6, 2004.

17. Ashimoto, A.; Chen, C.; Bakker, I.; Slots, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol. Immunol.*, 11: 266-73, 1996.

18. Doern, G.V.; Jones, R.N.; Gerlach, E.H.; Washington, J.A.; Biedenbach, D.J.; Brueggemann, A. Multicenter clinical laboratory evaluation of a beta-lactamase disk assay employing a novel chromogenic cephalosporin, S1. *J Clin Microbiol.*, 33:1665-7, 1995.
19. Gaetti-Jardim Jr, E.; Landucci, LF; Lins, SA; Vieira, EMM; Oliveira, SR. Susceptibility of strict and facultative anaerobes Isolated from endodontic infections to metronidazole and b-lactams. *Appl. Oral Sci.*, 15:539-545, 2007.
20. Boyanova, L.; Kolarov, R.; Gergova, G.; Deliverska, E.; Madjarov, J.; Marinov, M. Anaerobic bacteria in 118 patients with deep-space head and neck infections from the University Hospital of Maxillofacial Surgery, Sofia, Bulgaria. *J. Med. Microbiol.*, 55:1285-9, 2006.
21. Al-Haroni, M.H.; Skaug, N.; Al-Hebshi, N.N. Prevalence of subgingival bacteria resistant to aminopenicillins and metronidazole in dental patients from Yemen and Norway. *Int. J Antimicrob Agents.*, 27:217-23, 2006.
22. Okeke, I.N.; Lamikanra, A.; Edelman, R. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. *Emerg Infect Dis.*, 5:18-27, 1999.
23. Volpato, D.E.; Souza, B.V.; Rosa, L.G.D.; Melo, L.H.; Daudt, C.A.S.; Deboni L. Use of antibiotics without medical prescription. *The Brazilian J. Infect. Dis.*, 9(3):288-91, 2005.
24. Wybo, I.; Pierard, D.; Verschraegen, I.; Reynders, M.; Vandoorslaer, K.; Delmee, M.; Glupczynski, Y.; Gordts, B.; Ieven, M.; Melin, P.; Struelens, M.; Verhaegen, J.; Lauwers, S. Third Belgian multicentre survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J Antimicrob Chemother.*, 59:132-9, 2007.
25. Glupczynski, Y.; Berhin, C.; Nizet, H. Antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria in Belgium as determined by E-test methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, DOI 10.1007/s10096-008-0624-1. (In press).

26. Stelling, I.M.; Travers, K.; Jones, R.N.; Turner, P.J.; O'Brien, T.F.; Levy, S.B. Integrating *Escherichia coli* antimicrobial susceptibility data from multiple surveillance programs. *Emerg. Infect Dis.* 11: 873-882, 2005.
27. Silva, M.F.; Vaz-Moreira, I.; Gonzalez-Pajuelo, M.; Nunes, O.C.; Manaia, C.M. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 60: 166-176, 2007.
28. Jacinto, R.C.; Gomes, B.P.F.A.; Ferraz, C.C.R.; Zaia, A.A.; Souza Filho, F.J. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated bacteria. *Oral Microbiol Immunol.*, 18: 285-92, 2003.
29. Liu, C-Y; Huang, Y-T; Liao, C-H; Yen, L-C.; Lin, H-Y.; Hsueh, P-H. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52:3161-3168, 2008.
30. Baudry, P.J.; Nichol, K.; DeCorby, M; Mataseje, L.; Mulvey, M. R.; Hoban, D. J.; Zhanel, G. G. Comparison of antimicrobial resistance profiles among extended-spectrum- β -lactamase-producing and acquired AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Canadian intensive care units. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52: 1846-1849, 2008.
31. Goldstein, E. J. C.; Citron, D. M.; Warren, Y. A.; Tyrrell, K. L.; Merriam, C. V.; Fernandez, H. T. In vitro activities of dalbavancin and 12 other agents against 329 aerobic and anaerobic GRAM-positive isolates recovered from diabetic foot infections. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50:2875-2879, 2006.
32. Handal, T.; Olsen, I.; Walker, C.B.; Caugant, D.A. β -Lactamase production and antimicrobial susceptibility of subgingival bacteria from refractory periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.*, 19:303-8, 2004.

33. Pitout, J.D.D.; Nordmann, P.; Laupland, K.B.; Poirel, L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56, 52-59, 2005.
34. Al-Haroni, M.; Skaug, N.; Bakken, V.; Cash, P. Proteomic analysis of ampicillin-resistant oral *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol Immunol.*, 23: 36–42, 2008.
35. Pérez-Pérez, F.J.; Hanson, N.D. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 40(6): 2153-2162, June 2002.
36. Rice, L.B.; Bellais, S.; Carias, L.L.; Hutton-Thomas, R.; Bonomo, R.A.; Caspers, P.; Page M.G.P.; Gutmann, L. Impact of specific *pbp5* mutations on expression of β -lactam resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother.*, 48(8): 3028-3032, August 2004.
37. Tenover, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.*, 34: 3-10, 2006.
38. Iwahara, K.; Kuriyama, T.; Shimura, S.; Williams, D.W.; Yanagisawa, M.; Nakagawa, K.; Karasawa, T. Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the β -lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by Real-Time PCR. *J Clin Microbiol.*, 44: 172-6, 2006.
39. Fontana, R., M. Aldegheri, M. Ligozzi, H. Lopez, A. Sucari, and G. Satta. 1994. Overproduction of a low-affinity penicillin-binding protein and high-level ampicillin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 38:1980-1983.
40. Rybkine, T.; Mainardi, J.L.; Sougakoff, W.; Collatz, E.; Gutmann, L. Penicillin-binding protein 5 sequence alterations in clinical isolates of *Enterococcus faecium* with different levels of β -lactam resistance. *J. Infect. Dis.*, 178:159-163, 1998.
41. Signoretto, C.; Canepari, P.; Perry, A.M.; Ton-That, H.; Mazmanian, S.K.; Schneewind, O. Paradoxical effect of inserting, in *Enterococcus faecalis* penicillin-binding protein 5, an

amino acid box responsible for low affinity for penicillin in *Enterococcus faecium*. *Arch. Microbiol.*, 173:213-219, 2000.

42. Baquero, F.; Reig, M. Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11:1016-20,1992.

43. Aldridge, K. E.; Ashcraft, D.; Cambre, K.; Pierson, C. L.; Jenkins, S. G.; Rosenblatt, J. E. Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45:1238-1243, 2001.

44. Bosco, J.M.D.; Oliveira, S.R.; Bosco, A.F.; Schweitzer, C.M.; Gaetti-Jardim Jr, E. Influence of local tetracycline on the microbiota of alveolar osteitis in rats. *Braz Dent J.*, 19(2): 119-123, 2008.

45 Katsandri, A.; Avlami, A.; Pantazatou, A.; Petrikos, G. L.; Legakis, N. J.; Papaparaskevas, J. In vitro activities of tigecycline against recently isolated GRAM-negative anaerobic bacteria in Greece, including metronidazole-resistant strains. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, 55:231-236, 2006.

46. Roberts, M.C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.*, 19, 1-24, 1996.

47. 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.*, 8:75-9, 1993.

Tabela 1. Susceptibilidade a β -lactâmicos de aeróbios e anaeróbios facultativos isolados da cavidade oral de edêntulos, pacientes com gengivite e periodontite.

Microrganismo (N)	Resistência Prevalência N (%)						Produção de β -lactamases
	AM	AMC	CF	CP	IM	ME	
<i>C. freundii</i> (7)	4 (57.14)	2 (28.57)	3 (42.86)	3 (42.86)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (57.14)
<i>E. cloacae</i> (18)	14 (77.77)	9 (50.0)	11 (61.11)	11 (61.11)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (72.22)
<i>E. intermedius</i> (6)	2 (33.33)	2 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (33.33)
<i>E. sakazakii</i> (9)	4 (44.44)	1 (11.11)	2 (22.22)	9 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (44.44)
<i>Enterococcus</i> sp. (18)	4 (22.22)	0 (0.0)	6 (33.33)	7 (38.89)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>E. faecalis</i> (31)	6 (19.35)	0 (0.0)	3 (9.68)	12 (38.71)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>E. faecium</i> (8)	4 (50.0)	0 (0.0)	4 (50.0)	4 (50.0)	2 (25.0)	1 (12.5)	0 (0.0)
<i>E. coli</i> (6)	4 (66.67)	1 (16.67)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (66.67)
<i>K. oxytoca</i> (11)	7 (63.63)	5 (45.45)	1 (9.09)	3 (27.27)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (63.63)
<i>K. pneumoniae</i> (3)	3 (100.0)	2 (66.67)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (100.0)
<i>M. morgani</i> (17)	12 (70.59)	9 (52.94)	5 (29.41)	9 (52.94)	1 (5.88)	1 (5.88)	12 (70.59)
<i>P. agglomerans</i> (7)	6 (85.71)	6 (85.71)	3 (42.86)	3 (42.86)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (85.71)
<i>P. mirabilis</i> (5)	3 (60.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (40.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (80.0)
<i>P. vulgaris</i> (7)	5 (71.43)	2 (28.57)	1 (14.29)	1 (14.29)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (71.43)
<i>P. alcalifaciens</i> (6)	4 (66.67)	4 (66.67)	1 (16.67)	2 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (66.67)
<i>P. aeruginosa</i> (15)	13 (86.67)	13 (86.67)	8 (53.33)	9 (60.0)	2 (13.33)	2 (13.33)	0 (0.0)
<i>P. fluorescens</i> (9)	7 (77.77)	5 (55.55)	1 (11.11)	2 (22.22)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>S. liquefaciens</i> (9)	6 (66.67)	6 (66.67)	2 (22.22)	3 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (66.67)
<i>Serratia</i> sp. (9)	7 (77.77)	5 (55.55)	5 (55.55)	5 (55.55)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (77.78)
<i>Staphylococcus</i> sp. (9)	4 (44.44)	1 (11.11)	4 (44.44)	4 (44.44)	1 (11.11)	1 (11.11)	6 (66.67)
<i>S. aureus</i> (10)	6 (60.0)	5 (50.0)	4 (40.0)	4 (40.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (60.0)
<i>S. epidermidis</i> (17)	4 (23.53)	4 (23.53)	4 (23.53)	5 (29.41)	1 (12.5)	0 (0.0)	6 (35.29)
<i>S. hominis</i> (8)	4 (50.0)	4 (50.0)	1 (12.5)	1 (12.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (50.0)

<i>Streptococcus</i> spp. (50)	2 (4,0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (4,0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Total (304)	135 (44.41)	86 (28.29)	69 (22.7)	101 (33.22)	7 (2.3)	5 (1.64)	104 (34.21)

AM, ampicilina; AMC, amoxicilina/ácido clavulânico; CF, ceftioxitin; CP, cefalotin; IM, imipenem; ME, meropenem.

Tabela 2. Susceptibilidade a β -lactâmicos de 280 isolados de anaeróbios estritos e microaerófilos isolados da cavidade oral em pacientes edêntulos, pacientes com gengivite e periodontite.

Microrganismo (N)	Resistência Prevalência N (%)						Produção de β -lactamases
	AM	AMC	CF	CP	IM	ME	
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (10)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Bacteroides</i> sp. (7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.29)	2 (28.57)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (28.57)
<i>Campylobacter rectus</i> (10)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Capnocytophaga</i> spp. (11)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (9.09)	1 (9.09)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (9.09)
<i>Eikenella corrodens</i> (8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Eubacterium</i> sp. (16)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Fusobacterium</i> sp. (13)	1 (7.69)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (15.38)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (15.35)
<i>F. nucleatum</i> (50)	4 (8.0)	0 (0.0)	1 (2.0)	6 (12.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (16.0)
<i>F. periodonticum</i> (12)	1 (8.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (8.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (8.33)
<i>F. necrophorum</i> (4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Peptostreptococcus</i> sp. (12)	2 (16,67)	0 (0.0)	1 (8,33)	2 (16,67)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (16,67)
<i>P. anaerobius</i> (7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.29)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>P. micros</i> (20)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (10.0)	2 (10.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (10.0)
<i>Porphyromonas</i> sp. (18)	1 (5.56)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.56)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.56)
<i>P. gingivalis</i> (27)	4 (14.81)	0 (0.0)	1 (3.7)	4 (14.81)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (14.81)
<i>P. endodontalis</i> (4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>P. intermedia</i> (20)	3 (15.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	3 (15.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (20.0)
<i>P. nigrescens</i> (10)	2 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (30.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (30.0)
<i>Propionibacterium</i> sp. (5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Selenomonas</i> spp. (6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Veillonella</i> sp. (20)	2 (10.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (10.0)
Total (270)	22 (8.15)	0 (0.0)	9 (3.33)	30 (11.11)	0 (0.0)	0 (0.0)	32 (11.85)

AM, ampicilina; AMC, amoxacilina/ácido clavulânico; CF, ceftioxin; CP, cefalotin; IM, imipenem; ME, meropenem.

Tabela 3. Susceptibilidade a amicacin, cloramfenicol, ciprofloxacina, doxiciclina, gentamicina, ácido nalidíxico, rifampicina, e tetraciclina de aeróbios e aneróbios facultativos isolados da cavidade oral de pacientes edêntulos com prótese total, pacientes com gengivite e pacientes com periodontite.

Microrganismo (N)	Resistência Prevalência (%)							
	AK	CHR	CPR	DC	GE	NA	RF	TE
<i>C. freundii</i> (7)	0 (0.0)	2 (28.57)	0 (0.0)	1 (14.29)	2 (28.57)	1 (14.29)	0 (0.0)	2 (28.57)
<i>E. cloacae</i> (18)	1 (5.55)	7 (38.89)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (38.89)	1 (5.55)	0 (0.0)	1 (5.55)
<i>E. intermedius</i> (6)	0 (0.0)	2 (33.33)	1 (16.67)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.67)	0 (0.0)	1 (16.67)
<i>E. sakazakii</i> (9)	0 (0.0)	3 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.11)	0 (0.0)	1 (11.11)
<i>Enterococcus</i> sp. (18)	12 (66.67)	8 (44.44)	0 (0.0)	3 (16.67)	0 (0.0)	4 (22.22)	0 (0.0)	7 (38.89)
<i>E. faecalis</i> (31)	26 (83.87)	11 (35.48)	0 (0.0)	4 (12.9)	3 (9.68)	22 (70.97)	0 (0.0)	19 (61.29)
<i>E. faecium</i> (8)	7 (87.5)	5 (62.5)	0 (0.0)	2 (25.0)	0 (0.0)	3 (37.5)	0 (0.0)	3 (37.5)
<i>E. coli</i> (6)	0 (0.0)	1 (16.67)	0 (0.0)	2 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16.67)
<i>K. oxytoca</i> (11)	0 (0.0)	1 (9.09)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (18.18)	1 (9.09)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>K. pneumoniae</i> (3)	0 (0.0)	1 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>M. morgani</i> (17)	1 (5.88)	5 (29.41)	0 (0.0)	1 (5.88)	1 (5.88)	2 (11.76)	1 (5.88)	7 (41.18)
<i>P. agglomerans</i> (7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (28.57)
<i>P. mirabilis</i> (5)	0 (0.0)	1 (20.0)	0 (0.0)	3 (60.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (40.0)
<i>P. vulgaris</i> (7)	0 (0.0)	2 (28.57)	0 (0.0)	2 (28.57)	1 (14.29)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.29)
<i>P. alcalifaciens</i> (6)	0 (0.0)	2 (33.33)	0 (0.0)	5 (83.33)	2 (33.33)	3 (50.0)	2 (33.33)	4 (66.67)
<i>P. aeruginosa</i> (15)	2 (13.33)	5 (33.33)	1 (6.67)	7 (46.67)	5 (33.33)	13 (86.67)	3 (20.0)	11 (73.33)
<i>P. fluorescens</i> (9)	0 (0.0)	2 (22.22)	0 (0.0)	1 (11.11)	0 (0.0)	1 (11.11)	2 (22.22)	3 (33.33)
<i>S. liquefaciens</i> (9)	0 (0.0)	3 (33.33)	0 (0.0)	4 (44.44)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (44.44)	5 (55.55)
<i>Serratia</i> sp. (9)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (11.11)	0 (0.0)	3 (33.33)	1 (11.11)	5 (55.55)
<i>Staphylococcus</i> sp. (9)	2 (22.22)	2 (22.22)	1 (11.11)	1 (11.11)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>S. aureus</i> (10)	3 (30.0)	2 (20.0)	4 (40.0)	2 (20.0)	1 (10.0)	2 (20.0)	1 (10.0)	6 (60.0)
<i>S. epidermidis</i> (17)	3 (17.65)	5 (29.41)	6 (35.29)	5 (29.41)	2 (11.76)	3 (17.65)	3 (17.65)	10 (58.82)

<i>S. hominis</i> (8)	0 (0.0)	1 (12,5)	3 (37,5)	1 (12,5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (50.0)
<i>Streptococcus</i> spp. (50)	2 (4.0)	2 (4.0)	4 (8.0)	2 (4.0)	0 (0.0)	2 (4.0)	0 (0.0)	6 (12.0)
Total (304)	59 (19.41)	73 (24.01)	20 (6.58)	47 (15.46)	26 (8.55)	64 (21.05)	17 (5,59)	101 (33.22)

AK, amicacin; CHR, cloramfenicol; CP, ciprofloxacina; DC, doxiciclina; GE, gentamicina; NA, ácido nalidíxico; RF, rifampicina; TE, tetraciclina.

Tabela 4. Susceptibilidade a clindamicina, doxiciclina, metronidazol, rifampicina e tetraciclina de 270 isolados de anaeróbios estritos e microaerófilos isolados da cavidade oral de pacientes edêntulos usuários de prótese total, pacientes com gengivite e pacientes com periodontite.

Microrganismo (N)	Resistência Prevalência N (%)						
	AZ	CLIN	DC	ER	MZ	RF	TE
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (10)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (20.0)	6 (60.0)	0 (0.0)	1 (10.0)
<i>Bacteroides</i> sp. (7)	0 (0.0)	1 (14.29)	0 (0.0)	2 (28.57)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (14.29)
<i>Campylobacter rectus</i> (10)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (10.0)	1 (10.0)	4 (40.0)	1 (10.0)	1 (10.0)
<i>Capnocytophaga</i> spp. (11)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (9.09)	1 (9.09)	5 (45.45)	0 (0.0)	1 (9.09)
<i>Eikenella corrodens</i> (8)	0 (0.0)	1 (12.5)	0 (0.0)	1 (12.5)	4 (50.0)	0 (0.0)	1 (12.5)
<i>Eubacterium</i> sp. (16)	1 (6.25)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.25)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (6.25)
<i>Fusobacterium</i> sp. (13)	1 (7.29)	0 (0.0)	1 (7.29)	3 (23.08)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (7.29)
<i>F. nucleatum</i> (50)	2 (4.0)	0 (0.0)	2 (4.0)	18 (36.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (6.0)
<i>F. periodonticum</i> (12)	1 (8.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>F. necrophorum</i> (4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>Peptostreptococcus</i> sp. (12)	2 (16.67)	0 (0.0)	1 (8.33)	4 (33.33)	0 (0.0)	0 (0.0)	4 (33.33)
<i>P. anaerobius</i> (7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>P. micros</i> (20)	1 (5.0)	1 (5.0)	2 (10.0)	5 (25.0)	1 (5.0)	0 (0.0)	2 (10.0)
<i>Porphyromonas</i> sp. (18)	1 (5.56)	0 (0.0)	1 (5.56)	1 (5.56)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.56)
<i>P. gingivalis</i> (27)	2 (7.41)	0 (0.0)	1 (3.7)	4 (14.81)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (7.41)
<i>P. endodontalis</i> (4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
<i>P. intermedia</i> (20)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	2 (10.0)	0 (0.0)	2 (10.0)	2 (10.0)
<i>P. nigrescens</i> (10)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (10.0)
<i>Propionibacterium</i> sp. (5)	1 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	0 (0.0)

<i>Selenomonas</i> spp. (6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (16,67)
<i>Veillonella</i> sp. (20)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	1 (5.0)	0 (0.0)	1 (5.0)	2 (10.0)
Total (270)	12 (4.44)	3(1,11)	12 (4.44)	50 (18.52)	15 (5.56)	5 (1.85)	25 (9.26)

AZ, azitromicina; CLIN, clindamicina; DC, doxiciclina; ER, eritromicina; MZ, metronidazol; RF, rifampicina; TE, tetraciclina.

Anexos Gerais

Anexo A

Brazilian Journal of Microbiology

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope of the journal

Brazilian Journal of Microbiology, published by the Brazilian Society of Microbiology, publishes original research papers, short communications and, occasionally, reviews, covering all aspects of Microbiology. The publication is free of charge.

The following categories of papers are acceptable for publication in Brazilian Journal of Microbiology:

Research paper: the research paper reports results of original research, which has not been published elsewhere.

Short Communication: a Short Communication is a concise account of new and significant findings.

Mini-review: Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write the reviews.

Submission of a manuscript

Submission of a manuscript to **Brazilian Journal of Microbiology** is understood to imply that it has not previously been published (except in an abstract form) and that it is not being considered for publication elsewhere.

Manuscripts should be submitted on line at <http://www.bjmonline.com.br>. Instructions for on line submission are available at that site.

Upon receipt of a manuscript all authors will receive an electronic message acknowledging the receipt. The message will also question each author if he (or she) agrees with the submission. No answer will be considered as an agreement with the submission.

Responsibility for the accuracy of the manuscript content lies entirely with the authors.

Publication of a manuscript

Manuscripts are accepted for publication after having been critically reviewed by at least two referees, indicated by the Editors.

The suggestions and recommendations of the reviewers and Editors will be forwarded electronically to the corresponding author, who should return the reviewed manuscript to the Editors within the stipulated date, via online system. Whenever applicable, the corresponding author should explain or comment each modification introduced in the text.

The corresponding author will receive an electronic message whenever the manuscript moves from one status to the next.

Membership in Brazilian Society for Microbiology is not a prerequisite for submission of a manuscript for publication.

Nonmember scientists from Brazil and other countries are invited to submit papers for analysis.

The manuscript should be submitted as one single PDF file, containing the whole text, figures, tables, etc. Only manuscripts written in English will be considered.

For **research** papers, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese (up to 250 words)*
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Introduction
- h. Materials and Methods
- i. Results

- j. Discussion
- k. Acknowledgements (optional)
- l. References

For **short communications**, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 50 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 50 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text not divided in topics
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

For mini-reviews, the PDF file should contain:

- a. Title
- b. Abstract (up to 250 words)
- c. Three to five key-words
- d. Title (*Título*) in Portuguese*
- e. Abstract (*Resumo*) in Portuguese* (up to 250 words)
- f. Key words (*palavras-chave*) in Portuguese*
- g. Text
- h. Acknowledgements (optional)
- i. References

* BJM will provide the translation into Portuguese for non-Portuguese speakers.

All manuscripts should be typed double-spaced with 3 cm margins and pages should be numbered sequentially. The Editors recommend that a manuscript should be critically read by someone fluent in English before submission.

Manuscripts written in poor English will not be accepted.

Short Communications should be restricted to 10 printed pages. Figures and tables should be restricted to a maximum of two figures or two tables, or one table and one figure.

Abbreviations of terms and symbols should follow the recommendations of IUPAC-IUB Commission and the Metric System is to be used throughout.

As a rule, the references in the text should be cited by their numbers. The lines in each page should be numbered too. Exceptionally, when authors are mentioned in the text, the mention should be done according to the following examples:

Bergdoll (number) reported that..., Bailey and Cox (number) observed that..., or Smith *et al.* (number) mentioned that... Do not use capital letters.

ORGANIZATION

The **Title** should be as brief as possible, contain no abbreviations and be truly indicative of the subject of the paper.

Expressions like "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, should be avoided. Care should be exercised in preparing the title since it is used in literature retrieval systems.

The **Abstract** should summarize the basic content of the paper. The abstract should be meaningful without reference to the text. An abstract should not contain references, tables or unusual abbreviations. Abstracts are reprinted by abstracting journals and therefore will be read by persons who do not have access to the entire paper.

Resumo is the abstract written in Portuguese. Its preparation should follow the same recommendations for the Abstract in English. BJM will provide the Resumo for non-Portuguese speakers.

The **Introduction** should provide the reader with sufficient information so that the results reported in the paper can be properly evaluated without referring to the literature. However, the introduction should not be an extensive review of the literature. The introduction should also give the rationale for and objectives of the study that is being reported.

The **Materials and Methods** section should provide enough information for other investigators to repeat the work.

Repetition of details of procedures which have already been published elsewhere should be avoided. If a published method is modified, such modification(s) must be described in the paper. Sources of reagents, culture media and equipment (company, city, state, country) should be mentioned in the text. Names that are registered trade marks should be so indicated. Subheading often makes this section easier to read and understand.

The **Results** section should, by means of text, tables and/or figures, give the results of the experiments. If a *Discussion* section is to be included, avoid extensive interpretation of results but do so in the *Discussion* section. If *Results* and *Discussion* are combined, then results should be discussed where, in the text, is the more appropriate. Tables and figures should be numbered using Arabic numerals. All tables and figures must be mentioned in the text.

The approximate location of tables and figures in the text should be indicated.

The **Discussion** section should discuss the results in relation to the literature cited.

The **References** should be numbered consecutively and in alphabetical order, by last name of the first author. All authors must be cited. References should be cited in the text by their numbers, with a space between the number of the references (3, 7, 22). Journal names should be abbreviated according to the style of *BIOSIS*. All references given in the list should be cited in the text and all references mentioned in the text should be included in the list.

Examples:

a. Journal article

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S., Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Paper or chapter in a book

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Book

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patent

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Thesis and Dissertations

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidioides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Communications in events (Symposia, Conferences, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publication in the web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: [http:// www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html](http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html). Accessed 26 May 2006.

References citing "personal communication" or "unpublished data" are discouraged, although it is recognized that sometimes they must be used. In these cases, they should be cited in the text and not in the list of references. References consisting of papers that are "accepted for publication" or "in press" are acceptable. However, references of papers that are "submitted" or "in preparation" are not acceptable.

ACKNOWLEDGMENTS: This section is optional. It acknowledges financial and personal assistance.

TABLES: Each table must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. The title of a table should be placed in the top of it and should be brief but fully descriptive of the information contained. Headings and subheadings should be concise with columns and rows of data carefully centered below them.

FIGURES: Each figure must be typed in a separate sheet and numbered sequentially in Arabic number. Data presented in the tables should not be repeated in the figures. The legend of the figures should be placed at their bottom.

PHOTOGRAPHS: Photoprints should be of sufficient quality to ensure good reproduction (at least 150dpi).