

Família *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas* na microbiota bucal de pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva

Family *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *pseudomonads* in oral cavity and clinical specimens from patients in intensive care units

Familia *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* y *pseudomonas* en cavidad bucal y muestras clínicas de pacientes en unidades de cuidados intensivos

Elerson **GAETTI-JARDIM JÚNIOR**¹
 Ana Cláudia **OKAMOTO**¹
 Lívia Buzati **MECA**¹
 Paloma Pereira da **SILVA**¹
 Fábio **BOMBARDA**²
 Christiane Marie **SCHWEITZER**³

¹Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Araçatuba-SP, Brasil

²Santa Casa de Misericórdia de Araçatuba, Araçatuba-SP, Brasil

³Departamento de Matemática, Faculdade de Engenharia, UNESP-Univ. Estadual Paulista, Ilha Solteira-SP, Brasil

Resumo

Microorganismos entéricos, pseudomonados e outros oportunistas presentes na microbiota bucal têm sido associados a infecções graves em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI). O presente estudo avaliou a presença da família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* na boca de pacientes mantidos em UTI, correlacionando-a com condições bucais e sistêmicas. Foram obtidos dados referentes às condições de saúde, aspectos socioeconômicos, uso de medicamentos, consumo de drogas ilícitas e lícitas, história médica e familiar de pacientes mantidos por mais de 72 horas em UTI, com diagnóstico de infecção grave ou que desenvolveram essa condição após entrada na referida unidade. Cinquenta pacientes forneceram amostras clínicas de biofilme supra e subgingival, saliva e mucosas bucais, bem como secreções respiratórias para os pacientes com pneumonia, sangue e urina para os quadros de sepse. A presença dos microrganismos alvos foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e por cultura empregando-se meios seletivos. Os testes de Qui-Quadrado e de Mann-Whitney foram utilizados na análise estatística, e o nível de significância foi de 5%. As condições clínicas intrabucais dos pacientes se mostraram precárias. Dos microrganismos estudados, a família *Enterobacteriaceae* foi a mais prevalente, acometendo 39,5% das amostras de biofilme supragingival dos pacientes internados e 18,6% dos pacientes do grupo controle, além de ser o único grupo encontrado nas amostras extrabucais.

Descritores: Infecção Hospitalar; Periodontite; Placa Dentária; Reação em Cadeia da Polimerase.

Abstract

Enteric organisms, pseudomonads and other opportunistic microorganisms in the oral microbiota have been linked to serious infections in patients hospitalized in intensive care units (ICU). The present study evaluated the presence of family *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* in the mouth of patients in ICU, correlating it with oral and systemic conditions. Data on health, socioeconomic status, medication use, drug addiction, medical and family histories of patients held for more than 72 hours in the ICU with a diagnosis of severe infection or that developed this condition after entry in said unit were obtained. Fifty patients provided clinical samples of supragingival and subgingival biofilms, saliva and oral mucous membranes were collected, as well as respiratory secretions from patients with pneumonia, blood and urine for sepsis. The presence of target microorganisms was carried out by polymerase chain reaction (PCR) and by culture using selective media. The Chi-square and Mann-Whitney tests were used for statistical analysis, and the significance level was 5%. The intraoral clinical conditions of the patients were poor. The family *Enterobacteriaceae* was the most prevalent, affecting 39.5% of the supragingival biofilm samples of patients attended in ICU and 18.6% of patients in the control group, besides the rods were the only group found in extraoral samples.

Descriptors: Cross Infection; Periodontitis; Dental Plaque; Polymerase Chain Reaction.

Resumen

Los organismos entéricos, pseudomonados y otros microorganismos oportunistas en la microbiota bucal se han relacionado con infecciones graves en pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos (UCI). El presente estudio evaluó la presencia da familia *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Acinetobacter baumannii* en la boca de los pacientes en la UCI, y su correlación con las condiciones orales y sistémicas. Los datos sobre la salud, factores socioeconómicos, medicación, drogas legales o ilegales, historial médico, antecedentes familiares de los pacientes mantenidos por más de 72 horas en la UCI con diagnóstico de infección grave o pacientes cuya infección se desarrolló después de la hospitalización. Cinquenta pacientes proporcionaron muestras clínicas anteriores y biofilm subgingival, la saliva, las mucosas bucales y las secreciones respiratorias de los pacientes con neumonía, la sangre y la orina de los pacientes con sepsis. La presencia de microorganismos se llevó a cabo por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por cultivo usando medios selectivos. Las pruebas de Chi cuadrado y Mann-Whitney se utilizaron para el análisis estadístico, y el nivel de significación fue del 5%. Las condiciones clínicas intraorales de los pacientes mostraron pobres. De los microorganismos estudiados, la familia *Enterobacteriaceae* fue el más prevalente, afectando 39,5% de las muestras de biofilm supragingival y 18,6% de los pacientes en el grupo de control, además de ser el único grupo encontrado en muestras extraorales.

Descriptores: Infección Hospitalaria; Periodontitis; Placa Dental; Reacción en Cadena de la Polimerasa.

INTRODUÇÃO

A microbiota associada às infecções oportunistas e quadros sépticos em pacientes atendidos em unidades de terapia intensiva (UTI) é complexa e a boca pode desempenhar o papel de importante reservatório de microrganismos oportunistas, em particular os membros das famílias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Moraxellaceae*^{9, 11, 19, 31}, que apresentam rápida disseminação e resistência a diversos agentes antimicrobianos amplamente utilizados na área médica e odontológica^{12, 18} e podem estar envolvidos em quadros infecciosos periodontais^{12, 29} e infecções graves em pacientes mantidos em UTI³⁰.

Em condições favoráveis, como internações prolongadas, pacientes idosos, presença de dispositivos protéticos ou ortodônticos intrabucais, usuários de drogas, imunocomprometimento e traumas^{8, 11, 17, 30}, esses patógenos podem criar infecções verdadeiramente graves, o que, aliadas às dificuldades de se proceder a uma identificação rápida e determinação de padrões de susceptibilidade a antimicrobianos⁴, colaborando para a elevada mortalidade desses quadros.

Para reduzir a ocorrência dessas infecções em pacientes institucionalizados ou internados em tratamento de outras condições clínicas, diversos procedimentos vêm sendo advogados, como o controle mecânico e químico do biofilme, necessitando, para tanto, de preparo da equipe de saúde para a realização desses procedimentos^{18, 26}. Entretanto, pouco se conhece sobre o efeito desses procedimentos sobre a composição microbiana do biofilme, a médio e longo prazos, e sobre a microbiota residente da boca, tampouco se os mesmos são eficientes para controlar as populações dos principais patógenos oportunistas associados a esses quadros sépticos em pacientes mantidos em ambiente hospitalar.

O papel desempenhado pelas condições de saúde bucal e a composição dessa microbiota bucal podem ser de relevância no desenvolvimento e validação de medidas preventivas^{15, 16}, sendo que a eficácia dos

protocolos existentes é bastante questionável, onde estudos mostram que o uso de agentes como o digluconato de clorexidina se apresenta eficaz na prevenção de algumas dessas infecções²⁶, enquanto outros falham em fazer essa associação^{18, 20}. Dessa forma, a determinação de fatores individuais capazes de facilitar o desenvolvimento de quadros infecciosos graves e a eficácia dos procedimentos associados à prevenção dessas enfermidades, em pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva, pode colaborar para que novos protocolos de atendimento sejam instituídos e facilitar a recuperação desses pacientes²².

Em função da problemática da participação de membros desses microrganismos oportunistas no desenvolvimento das infecções oportunistas em pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva, o presente estudo teve o objetivo de avaliar a ocorrência de membros da família *Enterobacteriaceae*, das espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* e as condições de saúde bucal e ocorrência de infecções oportunistas associadas a esses microrganismos, incluindo os quadros septicêmicos e as infecções respiratórias.

MATERIAL E MÉTODO

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP (00065/2010).

• SELEÇÃO DOS PACIENTES COM INFECÇÕES GRAVES E GRUPO CONTROLE

Dos pacientes atendidos entre 2010 e 2012, em uma unidade de terapia intensiva em Araçatuba-São Paulo, foram selecionados 50 pacientes que apresentaram quadros infecciosos graves. Todas as informações referentes à identificação, idade ($53,4 \pm 27,9$ anos), condições de saúde, consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, uso de drogas ilícitas, renda e história social, níveis de colesterol, triglicérides, avaliação quantitativa e qualitativa do leucograma e contagem plaquetária eram transferidas para planilhas

de contingenciamento a partir dos dados fornecidos por familiares e pela equipe médica. Adicionalmente foram registrados os procedimentos clínicos instituídos e fármacos empregados, além de detalhes relativos ao período de internação dos pacientes. Os pacientes internados eram submetidos a uma avaliação das condições periodontais segundo os critérios do PSR e dentais, empregando-se, para tanto o índice CPOD. Biofilme clinicamente detectável também era avaliado (presença/ausência).

Amostras clínicas de saliva, biofilme supragengival, biofilme subgengival e mucosas bucais foram coletadas. Nos pacientes com infecções respiratórias, além das amostras bucais, procedia-se a obtenção de secreção respiratória, enquanto que sangue e urina eram obtidos dos pacientes com infecções generalizadas. Dos pacientes estudados, 23 apresentavam sepse, 15 mostravam-se portadores de pneumonia, 4 apresentavam traumatismo craniofacial e 8 estavam sob tratamento em função de dengue hemorrágica, desenvolvendo quadros infecciosos secundários.

Como grupo controle para os procedimentos microbiológicos foram selecionados 50 pacientes que apresentavam gênero, idade ($55,7 \pm 28,1$ anos), condições dentais e periodontais semelhantes aos pacientes atendidos em unidade de terapia intensiva, selecionados a partir do universo de pacientes atendidos e catalogados no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, por meio de um programa de busca parametrizada desenvolvido pela Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira-UNESP.

• COLETA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS

Tanto o grupo de pacientes atendidos em unidade de terapia intensiva quanto o grupo controle era composto de sete pacientes com próteses totais, 29 apresentavam sinais clínicos de gengivite e 14 eram portadores de periodontite, para garantir que as condições periodontais não fossem os principais elementos que diferenciavam os dois grupos.

Os espécimes clínicos de biofilme subgengival, supragengival, mucosa e saliva foram coletados após 72 horas de internação dos pacientes na UTI e após uma semana, quando necessário. Para a coleta de saliva utilizavam-se os dispositivos Salivettes. As amostras do biofilme supragengival foram removidas com auxílio de curetas esterilizadas, enquanto o biofilme subgengival foi coletado com o uso de cones de papel absorvente esterilizados, após a remoção do biofilme supragengival com algodão esterilizado. As amostras oriundas das mucosas bucais eram coletadas por meio de zaragatoas gentilmente friccionadas contra o dorso da língua, assoalho de boca, vestibulo bucal e mucosa jugal. A seguir, todos os espécimes clínicos foram transferidos para criotubos contendo água ultra-pura, que eram armazenados a -196°C , até a extração do DNA bacteriano, e em tubos contendo água peptonada, para os procedimentos de enriquecimento e isolamento microbiano.

Para os pacientes com secreções respiratórias, o aspirado brônquico e demais secreções envolvidas nos quadros infecciosos eram coletadas e transferidas para tubos contendo água ultra-pura e tubos com água peptonada. Para os pacientes apresentando quadros septicêmicos, amostras de sangue periférico (3mL) eram coletadas e mantidas em anticoagulante até o processamento laboratorial. Nesses quadros de sepse e quando os pacientes apresentavam envolvimento do sistema urinário, amostras de urina eram retiradas assepticamente das bolsas coletoras e enviadas para o laboratório em condições análogas às mencionadas para os espécimes intrabucais.

Os pacientes do grupo controle foram submetidos aos mesmos exames clínicos e à coleta dos espécimes de amostras bucais, como descrito acima para os pacientes atendidos em unidade de terapia intensiva.

• ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ALVO

Os espécimes clínicos foram processados dentro do intervalo de 4 horas de sua coleta. As amostras

eram submetidas a pré-enriquecimento em água peptonada e caldo EVA (Difco Laboratories, Rochester, NY, USA) a 37 °C, por 3 dias. Das amostras de água peptonada e caldo EVA com evidências de crescimento microbiano, alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em ágar Eosina Azul de Metileno, ágar MacConkey e ágar verde brilhante. Os meios de cultura eram incubados em aerobiose a 37 °C, por 48 h. A seguir, todas as colônias sugestivas de pertencerem à família *Enterobacteriaceae* e as espécies *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* foram submetidas a subcultivos para obtenção de cultura pura e, a seguir, identificadas em nível de espécie ou gênero por meio de testes bioquímicos^{10, 11}.

• DETECÇÃO DOS MICRORGANISMOS ALVO POR PCR

O DNA das amostras clínicas nos criotubos com água Milli Q foi extraído através do “kit” QIamp DNA Mini Kit (QIagen, Hilden, Alemanha), segundo as especificações do fabricante, e o DNA obtido era mantido a -80°C, até as reações de amplificação. As concentrações de DNA bacteriano foram determinadas em espectrofotômetro ($A_{260\text{ nm}}$). A presença de membros da família *Enterobacteriaceae* foi avaliada por meio de amplificação do DNA microbiano através da reação em cadeia da polimerase (PCR), empregando-se iniciadores e condições específicas^{10, 19, 31}.

A amplificação do DNA foi realizada em volumes de 25 µl, contendo 2,5 µl de 10 X tampão PCR, 1,25 µl de $MgCl_2$ (50 mM), 2,0 µl de dNTP (10 mM), 0,25 µl de *Taq* DNA polimerase (0,5 U), 1,0 µl de cada iniciador (0,4 µM), 7 µl de água ultrapura Milli-Q esterilizada e 10 µl de DNA (ng). A amplificação foi realizada em aparelho de PCR (Perkin Elmer, GeneAmp PCR System 2400) programado para: 1 ciclo de 94°C (5 min.); 36 ciclos de 94°C (1 min.), 52°C. por 1 min., 72°C (1 min.) e 1 ciclo de 72°C (5 min.), para a extensão final da cadeia de DNA em amplificação. Os produtos da amplificação pelo PCR eram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e fotografados sobre transiluminador de

ultravioleta com câmara Kodak (Eletrophoresis Documentation and Analyses System 120). Como padrão de peso molecular será utilizado o marcador 1Kb DNA ladder (Gibco, SP).

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste de Qui-Quadrado foi utilizado para avaliar a significância das associações entre três ou mais elementos. As comparações dicotômicas foram avaliadas através do teste de Mann-Whitney. A análise foi realizada no Departamento de Matemática da Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira-UNESP. O nível de significância adotado foi de 5%.

RESULTADOS

Observou-se homogeneidade entre os integrantes do grupo de pacientes internados em unidade de terapia intensiva e o grupo controle no tocante aos dados de distribuição por gênero, idade e condição periodontal. Todos os pacientes, dos dois grupos experimentais apresentavam abundante biofilme supra e subgingival. Os dados das Tabelas 1 e 2 evidenciam que a ocorrência de membros da família *Enterobacteriaceae* foi significativamente mais frequente no biofilme de pacientes hospitalizados, em relação ao grupo controle (teste de Qui-Quadrado, $p < 0,01$).

Entre os pacientes internados, a condição periodontal não interferiu com a presença desses microrganismos alvo, que mostraram relação positiva com a presença de biofilme (teste de Mann-Whitney, $p < 0,01$), o que também ocorreu no grupo controle (teste de Mann-Whitney, $p = 0,023$). Nos pacientes do grupo controle, a presença de *Enterobacteriaceae* e *A. baumannii* foi mais frequente em pacientes com perda óssea (teste de Mann-Whitney, $p = 0,028$).

Através de cultura, os isolados mais frequentes foram *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* sp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *E. intermedius*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. sakazakii* e *Proteus* sp., nos dois grupos de pacientes. Apenas os gêneros *Acinetobacter* e *Enterobacter* apresentaram,

isoladamente, ocorrência aumentada quando analisados separadamente, em relação ao grupo controle (teste de Qui-Quadrado, $p=0,03$). A maioria dos indivíduos internados em unidade de terapia intensiva com histórico de uso de antimicrobianos apresentava pelo

menos uma dessas espécies ou outro membro da família *Enterobacteriaceae*, mas que não pôde ser identificado em nível de espécie ou gênero pela amplificação do DNA. Essa associação com antimicrobianos foi significativa (teste de Qui-quadrado, $p<0,05$).

Tabela 1. Ocorrência de membros da família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* em amostras clínicas de pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva e do grupo controle. Dados obtidos por PCR.

Espécime clínico	Grupo Experimental N(%)					
	UTI ⁵			GC ⁶		
	A.b ³	P.a ⁴	FE ⁵	A.b	P.a	FE
Bio. supragengival ⁶	9 (20,3)	5 (11,6)	17 (39,5)	4 (9,3)	3 (7,0)	8 (18,6)
Biof. subgengival ⁶	11 (25,6)	7 (16,3)	11 (25,6)	4 (9,3)	4 (9,3)	8 (18,6)
Sangue ⁷	0 (0,0)	0 (0,0)	2 (8,7)	- ¹⁰	-	-
Saliva ⁸	9 (18,0)	5 (10,0)	11 (22,0)	4 (8,0)	2 (4,0)	3 (6,0)
Mucosa ⁸	6 (12,0)	5 (10,0)	8 (16,0)	4 (8,0)	4 (8,0)	4 (8,0)
Urina ⁷	0 (0,0)	0 (0,0)	6 (26,1)	-	-	-
Sec. respiratória ⁹	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (26,7)	-	-	-

¹Pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva;

²Pacientes do grupo controle;

³A.b= *Acinetobacter baumannii*

⁴P.a= *Pseudomonas aeruginosa*

⁵FE= família *Enterobacteriaceae*

⁶Biofilme supragengival e subgengival N= 43;

⁷Amostras de sangue e urina N= 23;

⁸Amostras de saliva e mucosa N= 50;

⁹Secreção respiratória N= 15;

¹⁰Amostras de urina, secreção respiratória e sangue são restritas ao grupo de pacientes mantidos em unidade de terapia intensiva.

Tabela 2. Ocorrência de espécies da família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* em amostras clínicas de pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva e do grupo controle. Dados obtidos por cultura.

Espécime clínico	Grupo Experimental N(%)					
	UTI ⁵			GC ⁶		
	A.b ³	P.a ⁴	FE ⁵	A.b	P.a	FE
Bio. supragengival ⁶	6 (14,0)	5 (11,6)	13 (30,2)	3 (7,0)	3 (7,0)	8 (18,6)
Biof. subgengival ⁶	9 (20,9)	7 (16,3)	11 (25,6)	4 (9,3)	4 (9,3)	7 (16,3)
Sangue ⁷	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	- ¹⁰	-	- ⁷
Saliva ⁸	5 (10,0)	3 (6,0)	5 (10,0)	4 (8,0)	1 (2,0)	1 (2,0)
Mucosa ⁸	5 (10,0)	5 (10,0)	8 (16,0)	2 (4,0)	2 (4,0)	4 (8,0)
Urina ⁷	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (17,4)	-	-	-
Sec. respiratória ⁹	0 (0,0)	0 (0,0)	4 (26,7)	-	-	-

¹Pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva;

²Pacientes do grupo controle;

³A.b= *Acinetobacter baumannii*

⁴P.a= *Pseudomonas aeruginosa*

⁵FE= família *Enterobacteriaceae*

⁶Biofilme supragengival e subgengival N= 43;

⁷Amostras de sangue e urina N= 23;

⁸Amostras de saliva e mucosa N= 50;

⁹Secreção respiratória N= 15;

¹⁰Amostras de urina, secreção respiratória e sangue são restritas ao grupo de pacientes mantidos em unidade de terapia intensiva.

Os espécimes extraorais, como apresentado nas Tabelas 1 e 2, foram fonte frequente de membros da família *Enterobacteriaceae*. Não foram detectados *P. aeruginosa* e *A. baumannii* nos espécimes extrabucais.

Os resultados de frequência de detecção desses microrganismos foram semelhantes, independentemente do método utilizado, embora a presença desses microrganismos no sangue de

pacientes com sepse somente foi verificada através de PCR.

Os dados do PCR evidenciaram que os pacientes do grupo UTI com sinais de perda óssea mostraram a presença de pelo menos um dos microrganismos alvo em 92,9% das amostras de biofilme supragengival, enquanto entre os indivíduos do grupo controle tais patógenos oportunistas estiveram presentes em 35,7% das amostras.

DISCUSSÃO

O papel de microrganismos como *Klebsiella pneumoniae*^{4, 5}, *Acinetobacter baumannii*^{14, 24}, *P. aeruginosa*⁶ ou *Enterobacter cloacae*^{5, 24} são frequentemente observadas em pacientes imunocomprometidos no ambiente subgengival, mas não considerados como integrantes da microbiota bucal residente¹¹.

A família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* vêm ganhando destaque na literatura sobre a microbiota periodontal^{1, 6, 12, 29, 32}, principalmente em países em desenvolvimento, onde os pacientes apresentam maior prevalência dessas espécies^{4, 5}, o que pode estar associado ao maior emprego de antimicrobianos nessas populações, selecionando espécies microbianas menos susceptíveis a esses agentes ou deficiência de saneamento básico⁴. Em função de sua elevada ocorrência na saliva, que muito provavelmente reflete a contaminação do biofilme microbiano e das mucosas⁸, possivelmente constitui o veículo de disseminação desses microrganismos.

Essa discussão torna-se relevante quando se verifica que esses bastonetes Gram-negativos estão entre as principais causas de infecções nosocomiais^{27, 28}, por vezes envolvendo o sistema excretor, cardiovascular e respiratório. Os dados apresentados nas Tabelas 1 e 2, agrupando-se os dados obtidos por cultura e por PCR, evidenciam que os pacientes mantidos em unidade de terapia intensiva, mesmo que não tenham se mostrado inicialmente portadores de

enfermidades infecciosas, apresentam maior frequência de colonização por esses patógenos superinfectantes, o que possivelmente reflete a maior tolerância que desses microrganismos a condições ambientais desfavoráveis e ao acúmulo progressivo de biofilme, a despeito dos cuidados de enfermagem no sentido de minimizar a formação de biofilme supragengival. A prevalência desses patógenos de fato aumenta com o acúmulo de biofilme, como mostrado por Zhuang et al.³², mesmo em pacientes não portadores de quaisquer fatores predisponentes sistêmicos¹⁷.

Esse acúmulo de microrganismos em boca, refletindo as condições dos pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva, por vezes privados de maior controle sobre o biofilme, pode facilitar a implantação e a proliferação de microrganismos superinfectantes e oportunistas, como previamente observado em dispositivos ortodônticos¹⁷, reforçando a necessidade de maior atenção sobre as condições de saúde bucal e de higiene em pacientes internados, embora não existam protocolos plenamente seguros ou capazes de evitar a seleção de microrganismos resistentes ou tolerantes, bem como destituídos de efeitos colaterais indesejados no longo prazo^{18, 20}. Os cuidados com esses procedimentos devem respeitar as normas hospitalares de controle de infecção, uma vez que até escovas dentais podem colaborar para a transmissão desses microrganismos entre indivíduos diferentes⁷.

Os resultados de cultura e PCR evidenciaram que, no geral, as bactérias associadas às infecções respiratórias e urinárias também estavam presente nos espécimes clínicos bucais, embora não se possa afirmar que essa relação constitua um vínculo de causa-efeito, posto que a identidade gênica das mesmas não foi determinada. Nesse sentido, um microrganismo pode vir a colonizar secundariamente o ambiente bucal em função de contínua e prolongada exposição do biofilme e mucosa. No entanto, no geral, esses patógenos oportunistas já se encontram em números modestos nos ecossistemas bucais, ganhando maior relevância

quando as condições do hospedeiro e do ambiente o permitem². Essa realidade é ainda mais significativa em países em desenvolvimento, onde tais patógenos perfazem parcela relevante da microbiota autóctone de boca^{21, 25}, como evidenciado no presente estudo, para os indivíduos do grupo controle.

A relação entre esses bastonetes Gram-negativos e as enfermidades periodontais vem sendo realçada, principalmente para *A. baumannii*^{1, 29}, sendo que tais patógenos apresentam amplo arsenal de virulência capaz de agredir os tecidos periodontais do hospedeiro, como enzimas proteolíticas, exotoxinas e endotoxina, além de grande capacidade de aderência, capacidade de invasão celular e resistência aos antimicrobianos^{2, 4}. Essa maior tolerância e resistência a fármacos com atividade inibitória pode potencializar a disseminação dessas bactérias³⁰, como também observado no presente estudo, o que reforça a necessidade de instituir protocolos de controle do biofilme microbiano, principalmente considerando a participação de microrganismos menos susceptíveis na composição da microbiota e o estado de debilidade dos pacientes, o que já está bem estabelecido para pacientes com imunocomprometimento, particular os portadores do vírus da imunodeficiência humana adquirida^{3, 11, 13}.

Ainda são escassos os estudos que procuram correlacionar a ocorrência de infecções causadas por microrganismos oportunistas, infecções nosocomiais e a prevalência desses patógenos na boca, possivelmente em função dos diversos focos de contaminação presentes. Entretanto, os dados apresentados reforçam a possibilidade da colonização transitoria ou mesmo estável do ambiente bucal na disseminação desses microrganismos e esse aspecto não pode ser negligenciado em função da gravidade dos quadros sépticos observados.

Nesse sentido, é possível que o amplo arsenal de fatores de virulência que esses microrganismos entéricos possuem. Incluindo a produção de proteases e outras enzimas histolíticas, como colagenases, lipases e

quitinases, enzimas capazes de degradar imunoglobulinas e proteínas do sistema complemento, além de atividade citotóxica e endotóxica^{4, 23}, que podem colaborar para a destruição dos tecidos periodontais e, em pacientes com quadros de imunossupressão e outras condições, como desnutrição, anemia, insuficiência renal, estados de depressão da consciência, cirurgias prévias³⁰, pode colaborar para a disseminação desses microrganismos e o desenvolvimento de infecções sistêmicas.

CONCLUSÃO

O presente estudo observou uma maior ocorrência de microrganismos entéricos e oportunistas em espécies clínicas bucais de pacientes mantidos em unidades de terapia intensiva em relação ao controle, apresentando correlação com o aumento do biofilme bucal nesses pacientes. Os resultados reforçam a importância de minimizar o acúmulo e formação de biofilme nesses pacientes com necessidades muito particulares.

REFERÊNCIAS

1. Amaral CSF, Silva-Boghossian CM, Leão ATT, Colombo APV. Evaluation of the subgingival microbiota of alcoholic and non-alcoholic individuals. J Dent. 2011; 39:729-38.
2. Antipa C, Dascalu L, Chifiriuc MC, Lazar V, Bleotu C, Ruța SM. Isolation, identification and antibiotic susceptibility profiles in bacterial strains isolated from periodontal lesions. Ann Biol Res. 2014; 5:22-6 .
3. Back-Brito GN, El Ackhar VN, Querido SM, dos Santos SS, Jorge AO, Reis AS et al. *Staphylococcus* spp., *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* oral isolates from Brazilian HIV-positive patients. Correlation with CD4 cell counts and viral load. Arch Oral Biol. 2011; 56:1041-6.
4. Barbosa FCB, Mayer MPA, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial

- susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16:306-10.
5. Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce RM. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J Periodontol.* 2007; 78:696-704.
 6. Colombo AV, Barbosa GM, Higashi D, Di Micheli G, Rodrigues PH, Simionato MRL. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *J Med Microbiol.* 2013; 62:1592-1600.
 7. Contreras A, Arce R, Botero JE, Jaramillo A, Betancourt M. Toothbrush contamination in family members. *Rev Clin Period Implantol Rehabil Oral* 2010; 3:24-6.
 8. Gaetti-Jardim Jr E, Lins SA, Pereira MF, Coclete GA, Schweitzer CM. Saliva contamination by opportunistic microorganisms in drug addiction females. *Arch Health Invest.* 2013; 2:3-10.
 9. Gaetti-Jardim Jr E, Avila-Campos MJ, Ciesielski FIN, Sousa FRN. Occurrence of yeasts, pseudomonads and enteric bacteria in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. *Braz J Microbiol.* 2011; 42:1047- 55.
 10. Gaetti-Jardim Jr E, Monti LM, Ciesielski FIN, Gaetti-Jardim EC, Okamoto AC, Schweitzer CM, Avila-Campos MJ. Subgingival microbiota from *Cebus apella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. *Anaerobe* 2012; 18:263 - 9.
 11. Gaetti-Jardim Jr E, Nakano V, Wahasugi TC, Cabral FC, Gamba 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.* 2008; 39:257- 61.
 12. Gaetti-Jardim Jr E, Okamoto AC, Melo ME, Schweitzer CM. Opportunistic microorganisms in patients with head and neck trauma. *Arch Health Invest.* 2013; 2:16-23.
 13. Gonçalves LS, Gonçalves BM, Fontes TV. Periodontal disease in HIV-infected adults in the HAART era: clinical, immunological, and microbiological aspects. *Arch Oral Biol.* 2013; 58:1385-96.
 14. Gonçalves LS, Ferreira SM, Souza CO, Souto R, Colombo AP. Clinical and microbiological profiles of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive Brazilians undergoing highly active antiretroviral therapy and HIV-seronegative Brazilians with chronic periodontitis. *J. Periodontol.* 2007; 78:87-96.
 15. Grap MJ, Munro CL. Preventing ventilator-associated pneumonia: evidence-based care. *Crit Care Nurs Clin N Amer.* 2004; 16:349-58.
 16. Grap MJ, Munro CL, Unoki T, Hamilton A, Ward KR. Ventilator-associated pneumonia: the potential critical role of emergency medicine in prevention. *J Emerg Med.* 2012; 42:353-62.
 17. Hägg U, Kaveewatcharanont P, Samaranayake YH, Samarayake LP. The effect of fixed orthodontic appliances on the oral carriage of *Candida* species and *Enterobacteriaceae*. *Eur J Orthodontic* 2004; 26:623-9.
 18. Kusahara DM, Peterlini MAS, Pedreira MLG. Oral care with 0.12% chlorhexidine for the prevention of ventilator-associated pneumonia in critically ill children: randomised, controlled and double blind trial. *Int J Nurs Stud.* 2012; 49:1354-63.
 19. La Scola B, Raoult D. *Acinetobacter baumannii* in human body louse. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10:1671-3.
 20. Lam OLT, McGrath C, Li LSW, Samaranayake LP. Effectiveness of oral hygiene interventions against oral and oropharyngeal reservoirs of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative

- bacilli. Amer J Infect Control 2012; 40:175-82.
21. Li J, Nasidze I, Quinque D, Li M, Horz HP, Andre C et al. The saliva microbiome of *Pan* and *Homo*. BMC Microbiology 2013; 13:204.
 22. Marra AR, Rodrigues RG, Silva CVS, Caserta RA, Paes AT, Moura, DF et al. Successful prevention of ventilator-associated pneumonia in an intensive care setting. Amer J Infect Control 2009; 7:619-25.
 23. Molla A, Matsumura Y, Yamamoto T, Okamura R, Maeda H. Pathogenic capacity of proteases from *Serratia marcescens* and *Pseudomonas aeruginosa* and their suppression by chicken egg white ovomacroglobulin. Infect Immun. 1987; 55:2509-17.
 24. Nakou M, Kamma J, Gargalianos P, Laskaris G, Mitsis F. Periodontal microflora of HIV infected patients with periodontitis. Anaerobe 1997; 3:97-102.
 25. Nasidze I, Li J, Schroeder R, Creasey JL, Li M, Stoneking M. High diversity of the saliva microbiome in Batwa pygmies. PLoS One 2011; 6:e23352.
 26. Özçaka Ö, Basoglu ÖK, Buduneli N, Tasbakan MS, Bacakoglu F, Kinane DF. Chlorhexidine decreases the risk of ventilator-associated pneumonia in intensive care unit patients: a randomized clinical trial. J Periodont Res. 2012; 47:584-92.
 27. Pace CC, McCullough GH. The association between oral microorganisms and aspiration pneumonia in the institutionalized elderly: review and recommendations. Dysphagia 2010; 25:307-22.
 28. Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. Oral Dis. 2007; 13:508-12.
 29. Pérez-Chaparro P-J, Gonçalves C, Figueiredo LC, Faveri M, Lobão E, Tamashiro N et al. Newly identified pathogens associated with periodontitis: a systematic review. J Dent Res. 2014 (no prelo). DOI: 10.1177/0022034514542468
 30. Sopena N, Heras E, Casas I, Bechini J, Guasch I, Pedro-Botet ML et al. Risk factors for hospital-acquired pneumonia outside the intensive care unit: a case-control study. Amer J Infect Control 2014; 42:38-42.
 31. Spilker T, Coenye T, Vandamme P, Lipuma JJ. PCR-Based Assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2004; 42:2074-9.
 32. Zhuang L-F, Watt RM, Steiner S, Lang-Hua BH, Wang, R.; Ramseier CA et al. Subgingival microbiota of Sri Lankan tea labourers naïve to oral hygiene measures. J Clin Periodontol. 2014; 41:433-41.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

AUTOR PARA CORRESPONDÊNCIA

Elerson Gaetti-Jardim Júnior
Faculdade Odontologia de Araçatuba, UNESP
egaettij@foa.unesp.br

Submetido em 21/07/2014

Aceito em 31/07/2014