

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

DAVID ZUANAZZI MACHADO JUNIOR

**DETECÇÃO DE PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS NO BIOFILME DENTAL E
SALIVA DE INDIVÍDUOS HOSPITALIZADOS SUBMETIDOS À CIRURGIA DE
REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação de Mestrado

Rio de Janeiro

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

DAVID ZUANAZZI MACHADO JUNIOR

**DETECÇÃO DE PATÓGENOS RESPIRATÓRIOS NO BIOFILME DENTAL E
SALIVA DE INDIVÍDUOS HOSPITALIZADOS SUBMETIDOS À CIRURGIA DE
REVASCULARIZAÇÃO DO MIOCÁRDIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Mestrado), Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Odontologia (Periodontia).

Orientadora: Dr^a Ana Paula Vieira Colombo

Dr^o Carmelo Sansone

Rio de Janeiro

2009

Ficha Catalográfica

Machado Junior, David Zuanazzi.

Detecção de patógenos respiratórios no biofilme dental e saliva de indivíduos hospitalizados submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio / David Zuanazzi Machado Junior - Rio de Janeiro: UFRJ/F.O., 2009.

xix, 89f. : il.; 29,7 cm.

Orientadores: Ana Paula Vieira Colombo e Carmelo Sansone

Dissertação (Mestrado) – UFRJ / F.O. / Programa de Pós-graduação em Odontologia (Periodontia), 2009.

Referências bibliográficas: f.62-84.

1. Doença Periodontal. 2. Bactérias respiratórias. 3. Saliva. 4. Biofilme Dental. 5. PCR – Tese. I. Colombo, Ana Paula Vieira. II. Sansone, Carmelo. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Odontologia (Periodontia). IV. Título.

DAVID ZUANAZZI MACHADO JUNIOR

Detecção de patógenos respiratórios no biofilme dental e saliva de indivíduos hospitalizados submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio

Orientadores: Prof^a Dr^a Ana Paula Vieira Colombo
Prof^o Dr^o Carmelo Sansone

Rio de Janeiro, _____ de Janeiro de 2009.

Eduardo Jorge Feres Filho – Doutor

Faculdade de Odontologia – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Bernardo Rangel Tura – Doutor

Instituto Nacional de Cardiologia

Rafael Silva Duarte – Doutor

Prof. Adjunto do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Trabalho realizado no Instituto Nacional de Cardiologia e no Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Médica – UFRJ, sob a orientação da Prof^a Ana Paula Vieira Colombo e do Prof^o Carmelo Sansone.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus amados pais, por me criarem com amor e
dedicação, não medindo esforços para me
dar a melhor formação possível.

À minha amada esposa Maura, presente divino
em minha vida, pelo apoio em todos os
momentos e em todas as decisões.

À minha querida irmã Rebeca, pelos anos de
convivência e amizade.

AGRADECIMENTOS

A Deus, supremo Criador, de quem procede toda a ciência, sabedoria e todo conhecimento. Agradeço pelo dom da vida e por seu amor eterno incondicional. Por ter-me capacitado para a realização desse trabalho. A Ti, Senhor, toda honra e toda glória!

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Vieira Colombo pela confiança depositada desde o início. Por sempre buscar o que temos de melhor, investindo na nossa formação científica. Sua paixão pela pesquisa e pelo desenvolvimento científico inspira e contagia. Todo meu respeito, carinho e admiração a uma das grandes pesquisadoras desse país. Você faz diferença!

Ao Prof. Dr. Carmelo Sansone, por ter sempre acreditado no projeto e no meu trabalho. Pela amizade e apoio ao longo do curso e por ter participado nessa primeira etapa do meu desenvolvimento científico. Muito obrigado!

À minha esposa Maura, pela ajuda diária e constante no laboratório e em casa. Pela paciência, compreensão nos dias difíceis e por estar sempre ao meu lado, dividindo lágrimas e alegrias. Divido com você essa conquista!

À companheira de laboratório Renata Souto, pela imensa ajuda e ensinamentos. Por todo o auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho, principalmente nos assuntos voltados à Microbiologia e Biologia Molecular.

Ao amigo Marcelo Matos, pela amizade, pelo incentivo e ajuda imensurável ao logo desse período. Por iniciar comigo esse projeto e pela disposição em ajudar e fazer o que fosse necessário para que fosse concretizado.

Ao amigo Prof. Joel Alves Jr, por ter me apresentado a beleza da Periodontia como nunca tinha visto. Por ter me incentivado na minha escolha pela vida acadêmica e pelos momentos compartilhados durante essa caminhada.

Ao Dr. Bernardo Tura, pelo total apoio à realização dessa pesquisa no Instituto Nacional de Cardiologia dando total liberdade no seu desenvolvimento.

Ao Prof. Dr. Milton de Uzeda, por estar sempre disposto a ajudar no que fosse necessário. Pelo apoio ao trabalho e por sua presença cativante. Por ter me ensinado os primeiros passos da microbiologia oral.

Aos companheiros do laboratório de Microbiologia Oral, Carina Maciel, Lúcio Gonçalves e Débora Heller, pelas palavras de incentivo e por cada contribuição no decorrer do curso.

Ao companheiro Davi Barbirato, pela ajuda enorme na coleta de dados no INC e pelos momentos compartilhados. Seu interesse em aprender é contagiante.

Aos companheiros de mestrado, Hilana Artese, Vinícius Gaze, Celso Oliveria Cristine Amaral, Victor Varella, Florin, Maria, Suzane Matoso e Natasha Giovannetti, pela amizade e por todos os conhecimentos compartilhados.

Aos todos os professores da Pós-graduação de Faculdade de Odontologia da UFRJ, pelo conhecimento compartilhado,

Aos professores do Mestrado em Periodontia da UFRJ, Eduardo Feres, Maria Cynésia Torres, Anna Tereza Leão, pela inspiração e despertar em busca do conhecimento científico, por cada contribuição científica no meu processo de aprendizado.

Ao técnico Fernando Magalhães, por toda a ajuda e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia da UFRJ, em especial a Tia Arlene, pela ajuda e colaboração no decorrer do curso.

A todos os funcionários do Instituto Nacional de Cardiologia que contribuíram de muitas forma para que esse trabalho fosse concretizado.

Aos amigos de turma da graduação, Fábio Vidal, Rafael Freitas, Marcos Daniel, Jeter Bochina, Christiana Masulo, Cristiana Murad, Cláudia Reis, Leonardo Romano e Denys Vasconcellos, pelos momentos de descontração e pelo companheirismo. A amizade de vocês é muito importante para mim.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFRJ, por todo o conhecimento que me foi passado desde a graduação. Agradeço pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

À agência financiadora do projeto: FAPERJ.

À agência financiadora da minha bolsa de estudos: CAPES/UFRJ

A todos os pacientes do Instituto Nacional de Cardiologia que colaboraram com os exames e coletas, tornando esse trabalho viável

A todos aqueles que me apoiaram de alguma forma e que acreditam que apenas com lealdade e amizade conseguimos concretizar nosso sonhos.

“O coração do sábio adquire o conhecimento, e o ouvido dos sábios busca a ciência.”

Provérbios 18:15.

RESUMO

MACHADO JR., David Zuanazzi. Detecção de patógenos respiratórios no biofilme dental e saliva de indivíduos hospitalizados submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio. Orientadores: Ana Paula Vieira Colombo e Carmelo Sansone. FO/UFRJ, 2009. (Mestrado em Odontologia – Periodontia).

Introdução: Infecções nosocomiais continuam a ser uma das maiores causas de morbidade e mortalidade dentre pacientes hospitalizados, especialmente em unidades de terapia intensiva (UTI). A pneumonia é uma das infecções mais freqüentes em ambientes hospitalares. Estudos têm demonstrado que a cavidade oral pode ser um reservatório de vários patógenos de importância médica, incluindo patógenos respiratórios. **Objetivo:** O objetivo desse trabalho foi determinar a prevalência de patógenos respiratórios nosocomiais na cavidade oral de pacientes hospitalizados submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio tais como *Acinetobacter* spp., *Dialister pneumosintes*, *Pseudomonas* spp. e *Staphylococcus* spp., portadores ou não do gene de resistência *mecA*. **Materiais e Métodos:** Características demográficas, médicas e o exame periodontal foram realizados no início do estudo, na fase pré-operatória. A avaliação clínica periodontal foi realizada em 6 sítios por dente nos indivíduos dentados. A saliva foi coletada de todos os pacientes, enquanto que amostras de biofilme supra e subgingivais foram obtidas de 4-6 sítios dos pacientes dentados, antes da intubação orotraqueal (fase pré-cirúrgica) e após a extubação. Patógenos respiratórios foram detectados pelos métodos de PCR e cultura. Diferenças significativas nos parâmetros clínicos e prevalência dos diferentes patógenos entre indivíduos dentados ou edêntulos foram analisadas através dos testes de Mann-Whitney e Quiquadrado. Diferenças na prevalência das bactérias entre a fase pré e pós-cirúrgica foram analisadas através do teste de Wilcoxon. **Resultados:** A população alvo incluiu 30 pacientes hospitalizados (média de idade 63,5±1,7 anos; 77% homens; 13 edêntulos e 17 dentados) que passaram por cirurgia de revascularização do miocárdio. As freqüências bacterianas na saliva em ambos os grupos foram: *Pseudomonas* spp. (83.3%), *Staphylococcus* spp. (81.5%), *Acinetobacter* spp. (63.6%), *D. pneumosintes* (33.3%) e *Pseudomonas aeruginosa* (16.7%). Uma maior prevalência de *D. pneumosintes* foi observada nos DE (41,2%) do que nos edêntulos (23,1%), mas não houve diferença estatisticamente significativa. Nas amostras de placa dental, os dentados com >14 dentes mostraram uma maior prevalência de *Pseudomonas* spp. (100%) do que indivíduos com ≤14 dentes (69.1±12%; p=0.048). Entretanto, *P. aeruginosa* foi significativamente mais prevalente nos pacientes com menos dentes (35.5 ± 9.3%) do que pacientes com >14 dentes (5.7 ± 5.7%; p = 0.037). Todas as espécies de *Staphylococcus* foram coagulase-negativo (CNS), e cerca de 11% foram positivas para o gene *mecA*. Espécies de CNS carreadoras do gene *mecA*, mostraram uma tendência a aumentar em freqüência em todas as amostras após extubação, enquanto *P. aeruginosa* mostrou redução. Uma forte associação positiva foi encontrada entre a presença de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (rho=0.886, p<0.02), enquanto que *Staphylococcus* spp. mostraram correlação com *P. aeruginosa*

($\rho=0.962$, $p<0.002$) e sangramento à sondagem ($\rho=0.317$, $p<0.013$), após ajustar para sexo, fumo, idade e número de dentes. **Conclusão:** A cavidade oral de pacientes hospitalizados com doença periodontal abriga patógenos respiratórios em alta frequência, particularmente espécies de *Pseudomonas* e *Staphylococcus*, sustentando sua função de ser um reservatório para essas espécies.

Palavras-chave: Infecção nosocomial; Placa dental; saliva; patógenos respiratórios; doença periodontal, PCR

ABSTRACT

MACHADO JR., David Zuanazzi. Detection of respiratory pathogens in dental biofilm and saliva of hospitalized individuals undergoing myocardium revascularization surgery. Thesis Adviser: Ana Paula Vieira Colombo and Carmelo Sansone, FO/UFRJ, 2009. (Master in Dentistry – Periodontology).

Background: Nosocomial infections continue to be major causes of morbidity and mortality among hospitalized patients, especially in the intensive care unit (ICU). Pneumonia is one of the most frequent infections in hospital environments. Several studies have shown that the oral cavity may harbor “non-oral” bacteria, including various medically important pathogens, including respiratory pathogens. **Objective:** The purpose of this investigation was to determine the prevalence of specific nosocomial respiratory pathogens including *Acinetobacter* spp., *Dialister pneumosintes*, *Pseudomonas* spp., and *Staphylococcus* spp. with or without the *mecA* resistance gene in the oral cavity of hospitalized patients. **Material and Methods:** Periodontal clinical assessment was performed at 6 sites per tooth in the dentate subjects. Saliva was collected from all subjects, whereas supra- and subgingival biofilm samples were obtained from 4-6 periodontal sites of dentate subjects, before orotracheal intubation (preoperative phase) and after extubation. Respiratory pathogens were detected by PCR and cultivation methods. Patients were divided into dentate (DE) and edentulous (ED) for statistical analysis. Significance of differences in clinical parameters and bacterial frequency was sought by Mann-Whitney and Chi-Square tests. Differences in bacterial prevalence before and after surgery were analyzed by Wilcoxon test. **Results:** The target population included 30 hospitalized patients (mean age 63.5 ± 1.7 years; 77% males; 13 edentulous and 17 dentate) undergoing myocardial revascularization surgery. Demographic characteristics, medical and periodontal examination were recorded at baseline (preoperative phase). Bacterial frequency in saliva in both groups was: *Pseudomonas* spp. (83.3%), *Staphylococcus* spp. (81.5%), *Acinetobacter* spp. (63.6%), *Dialister pneumosintes* (33.3%), and *Pseudomonas aeruginosa* (16.7%). A higher prevalence of *D. pneumosintes* was observed in dentate (41.2%) than edentulous (23.1%), but no statistical significance was reached. In plaque samples, dentate with >14 teeth showed a higher prevalence of *Pseudomonas* spp. (100%) than individuals with ≤ 14 teeth ($69.1 \pm 12\%$; $p=0.048$). Conversely, *P. aeruginosa* was significantly more prevalent in subjects with fewer teeth ($35.5 \pm 9.3\%$) than with >14 teeth ($5.7 \pm 5.7\%$; $p = 0.037$). All staphylococci were CNS, and about 11% were positive for the *mecA* gene. CNS carrying the *mecA* gene showed a tendency to increase in all samples, whereas *P. aeruginosa* reduced after extubation. Strong positive associations between the presence of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. were found ($\rho=0.886$, $p<0.02$), whereas *Staphylococcus* spp. correlated with *P. aeruginosa* ($\rho=0.962$, $p<0.002$), and bleeding on probing ($\rho=0.317$, $p<0.013$), after controlling for gender, smoking, age, and number of teeth. **Conclusion:** The oral cavity of hospitalized patients with chronic periodontitis harbors high frequencies of respiratory pathogens, particularly *Pseudomonas*

spp. and *Staphylococcus* spp., supporting its potential role as a reservoir for these species.

KEY WORDS: nosocomial infection; dental plaque; saliva; respiratory pathogens; periodontal diseases, PCR

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xix
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	15
3. MANUSCRITO	16
4. DISCUSSÃO	49
5. CONCLUSÃO	62
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
7. ANEXOS	86
Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido	86
Anexo 2. Carta de Aprovação da Comissão de Ética	87
Anexo 3. Ficha de Anamnese	88
Anexo 4. Ficha Clínica Periodontal	90

ÍNDICE DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC – American Type Culture Collection

BP – bolsa periodontal

BS – biofilme supragengival

ClfA – Clumping factor A

CTAB – Hexadecyltrimethylammonium bromide

DE – Dentados

DAC – Doença Arterial Coronariana

DMSO – Dimetilsulfoxide

DNA – Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)

DP – Doença Periodontal

E – Esmalte Dentário

ED – Edêntulos

ECF – enhanced chemifluorescence

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

EJ – Epitélio Juncional

HC – Home Care

HIV – Human immunodeficiency virus (Vírus da imunodeficiência humana)

IL – interleucina

IPV – Índice de Placa Visível

JCE – Junção Cimento-esmalte

LPS – Lipopolissacarídeo

M – molar

MRSA – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MRSE – Methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*

mg – miligramas

ng – nanogramas

mL – mililitro

mM – milimolar

μL – microlitro

NCI – Nível Clínico de Inserção

pM – picomolar

pmol – picomol

pb – pares de base

PAC – Pneumonia Adquirida na Comunidade

PBS – Profundidade de bolsa à sondagem

PCR – Polymerase Chain Reaction

pH – Potencial de Hidrogênio

PN – Pneumonia Nosocomial

RNA – Ribonucleic acid (Ácido ribonucléico)

rRNA – Ribosomal Ribonucleic acid (Ácido ribonucléico ribossomal)

SCCmec – Staphylococcal Cassete Chromosome mec

CNS – Coagulase-negative *Staphylococcus*

SS – Sangramento à Sondagem

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate (Dodecil Sulfato de Sódio)

SPSS – Statistical Package for the Social Sciences

SSC – Saline Sodium Citrate

TC – tecido conjuntivo

TE – Tampão de tris-HCl e EDTA

TSB – Trypticase Soy Broth

U – unidades

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UTI – Unidade de Tratamento Intensivo

VAP – Ventilator-associated pneumonia

16S – Subunidade 16S do ribossomo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Anatomia do periodonto. (A)-Esquema de um periodonto com saúde periodontal. E, esmalte dentário. (B) Figura esquemática de uma lesão periodontal com a formação da bolsa periodontal. JCE, junção cimento-esmalte; TCI, tecido conectivo inflamado; EJ, epitélio juncional. Adaptado de LINDHE, 2003..... 4
- Figura 2. Produtos de amplificação do gel de agarose a 1,5% contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para iniciador universal do 16S bacteriano, *Acinetobacter* spp, *D. pneumosintes*, *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., CNS e gene *mecA*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo 16S bacteriano; 3- amostra de placa positiva para 16S bacteriano; 4- controle positivo para *Acinetobacter* spp. (*A. baumannii*, ATCC 19606), 5- amostra de placa positiva para *Acinetobacter* spp.; 6- controle positivo para *D. pneumosintes* (ATCC 33048); 7- amostra de placa positiva para *D. pneumosintes*; 8- controle positivo para *P. aeruginosa* ATCC 27853; 9- amostra de placa positiva para *Pseudomonas* spp.; 10- amostra de saliva positiva para *P. aeruginosa*; 11- controle positivo com DNA de MRSA USA 100; 12- amostra positiva para 16S bacteriano; 13- controle positivo com DNA de *S. epidermidis* (ATCC 14579); 14- amostra de placa positiva para CNS; 15- controle positivo para CNS com gene *mecA*; 16- amostra de placa positiva para CNS com gene *mecA*; 17- controle negativo..... 48

1. INTRODUÇÃO

A cavidade oral humana apresenta características ecológicas complexas, como a presença de várias superfícies distintas que podem ser colonizadas por uma grande quantidade e diversidade de bactérias, fungos ou vírus (Aas et al. 2005). Esses microrganismos interagem com o meio oral e seus componentes formando um complexo ecossistema que, em condições saudáveis, se apresenta em um estado de equilíbrio dinâmico (Socransky and Haffajee 2005; Eriksen et al. 2006). Mais de 700 espécies bacterianas já foram detectadas na cavidade oral, sendo que aproximadamente 50% delas não são cultiváveis (Paster et al. 2006). Em geral, cada indivíduo apresenta de 100 a 200 espécies habitando a cavidade oral, e há uma diversidade microbiológica significativa que varia entre um indivíduo e outro (Jenkinson and Lamont 2005; Paster et al. 2006). A composição microbiana da cavidade oral é determinada principalmente pela natureza da superfície colonizada (Socransky and Haffajee 2005). Cada sítio intra-oral apresenta características particulares que permitem a colonização por determinados microrganismos que melhor se adaptam ao meio (Takahashi 2005). Tal diferença na composição microbiana oral varia entre indivíduos, entre sítios distintos e entre sítios similares em um mesmo indivíduo (Socransky and Haffajee 2005). Dessa forma, são constituídas comunidades polimicrobianas organizadas, chamadas de biofilmes, cujas características dependem da localização intra-oral (superfícies dentárias, gengiva, mucosas, língua e próteses), das características genéticas e dos fatores imunológicos do indivíduo (Jenkinson and Lamont 2005).

O biofilme oral é uma complexa comunidade polimicrobiana embebida em uma matriz extracelular aderida a uma superfície da cavidade oral, seja ela dura (dente) ou mole (mucosas e língua) (O'Toole et al. 2000; Jenkinson and Lamont 2005). Particularmente, o biofilme dental é um dos mais complexos na natureza devido à sua diversidade microbiana, assim como por sua formação ocorrer sobre uma superfície não-descamativa, banhada por fluidos orais, tais como a saliva e fluido gengival. Essa característica favorece a colonização bacteriana e seu crescimento, que é auxiliado pela facilidade de co-agregação das espécies orais e pela abundância de nutrientes (Socransky and Haffajee 2002; ten Cate 2006). Os microrganismos formadores de biofilme vivem em consórcio (ten Cate 2006), no qual interagem competitivamente e cooperativamente (Takahashi 2005). Sua formação é fundamental para a sobrevivência das espécies, pois provê proteção contra microrganismos competidores, contra mecanismos de defesa do hospedeiro e substâncias tóxicas do meio, como antibióticos, além de facilitar a troca de nutrientes e remover produtos metabólicos nocivos aos membros do consórcio (Socransky and Haffajee 2002). Outra característica marcante do biofilme é a comunicação entre espécies da comunidade, a qual ocorre por meio de moléculas regulatórias auto-geradoras que atuam especificamente como sinais difusores de comunicação entre as células da população bacteriana e cuja regulação está associada à expressão de genes específicos. (Withers et al. 2001). Essa capacidade de comunicação é chamada de *quorum sensing* que é um componente essencial para o início da colonização bacteriana e subsequente desenvolvimento e funcionalidade do biofilme (Kolenbrander et al. 2002;

Socransky and Haffajee 2002). Além da sinalização, a alta densidade do crescimento bacteriano facilita o intercâmbio de informação genética entre células bacterianas da mesma espécie, entre espécies distintas e, até mesmo, entre gêneros distintos (Socransky and Haffajee 2002; Waters and Bassler 2005). Por exemplo, os processos de transferência gênica auxiliam no intercâmbio e expressão de genes de resistência a antibióticos, proporcionando proteção ao biofilme (Socransky and Haffajee 2002).

Apesar de a microbiota oral possuir um grande potencial patogênico, ela permanece em um estado equilíbrio com o hospedeiro. Esse equilíbrio ecológico é denominado de antibiose, caracterizando uma relação de antibiose ou simbiose (Rosebury 1966). Mudanças ecológicas na cavidade oral como, por exemplo, alterações de pH e nutrientes, podem trazer modificações a essa comunidade estabelecida. Os membros do consórcio microbiano compatível com saúde (microrganismos comensais) também podem mudar o meio através de processos fisiológicos, como as atividades metabólicas, criando condições favoráveis à instalação de microrganismos patogênicos ao consórcio. Essas mudanças nos ecossistemas microbianos orais podem resultar no aumento do seu potencial patogênico e, portanto, iniciar e promover doenças orais e doenças sistêmicas (Takahashi 2005). A influência de microrganismos e/ou doenças orais na saúde geral de indivíduos é relatada na literatura desde a antiguidade (O'Reilly and Claffey 2000). Entretanto, no final do século XIX foram publicados os primeiros trabalhos científicos propondo a teoria da infecção oral focal, a qual foi sustentada até meados do século XX. Essa teoria definia que infecções que ocorriam em diferentes partes do corpo através da

disseminação pela corrente sanguínea (bacteremia) eram causadas por microrganismos (e seus produtos) que habitavam a cavidade oral (Gendron et al. 2000). O recente progresso na classificação e identificação da microbiota associada às doenças orais distintas, como as doenças periodontais, tem levado o reconhecimento da importância da infecção oral focal (Li et al. 2000).

As doenças periodontais são infecções crônicas de etiologia polimicrobiana que induzem uma resposta inflamatória do hospedeiro que afetam o periodonto podendo ocasionar destruição tecidual (gengiva, inserção conjuntiva, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar) com perda de inserção óssea, e eventual perda dentária (Loesche and Grossman 2001; Socransky and Haffajee 2002) (Figura 1).

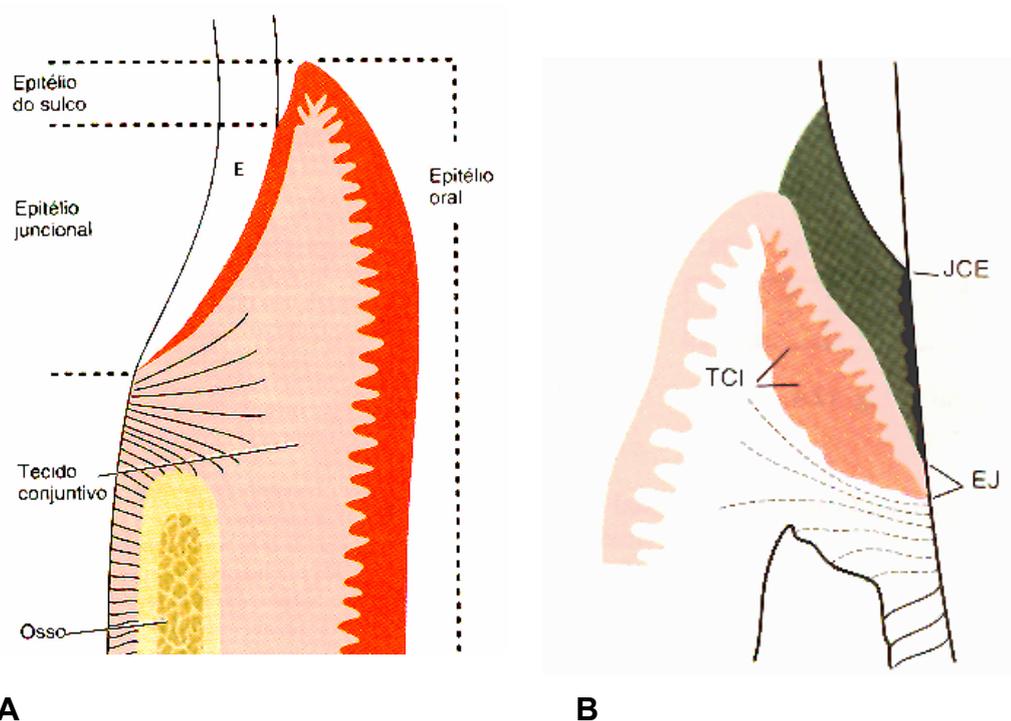


Figura 1. Anatomia do periodonto. (A)-Esquema de um periodonto com saúde periodontal. E, esmalte dentário. (B) Figura esquemática de uma lesão periodontal com a formação da bolsa periodontal. JCE, junção cemento-

esmalte; TCI, tecido conectivo inflamado; EJ, epitélio juncional. Adaptado de Lindhe, 2003.

As doenças periodontais podem ser divididas basicamente em dois grupos: gengivites e periodontites. As gengivites se caracterizam pela presença de inflamação gengival e ausência de qualquer perda de inserção conjuntiva e óssea. As periodontites são classificadas em crônicas (leve, moderada ou severa) e agressivas (localizadas ou generalizadas) (Armitage 1999), e suas principais características clínicas são inflamação gengival, perda óssea, mobilidade dentária e formação da bolsa periodontal, que é definida como aprofundamento patológico do sulco gengival pela migração apical do epitélio juncional (Page and Kornman 1997; Page et al. 1997). A periodontite crônica é a forma mais comum, caracterizada pela progressão lenta a moderada, com surtos de exacerbação; presença de placa dental e cálculo sub e supra-gengivais; e acomete principalmente indivíduos com idade acima de 35 anos. A outra forma de periodontite, chamada de agressiva, caracteriza-se pela pouca presença de cálculo e biofilme dental; por sua progressão rápida; e por afetar uma pequena parcela da população, cujos principais acometidos são crianças e indivíduos jovens (Armitage 1999).

De modo geral, as periodontites são infecções polimicrobianas mistas com predominância de bactérias anaeróbias gram-negativas e microaerófilas (Page and Kornman 1997). Dentre as principais espécies frequentemente associadas à doença periodontal destacam-se *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Prevotella*

intermedia, *Prevotella nigrescens* e *Eubacterium nodatum*. A presença destas espécies está diretamente relacionada com o aumento da profundidade de bolsa e perda de inserção progressiva (Socransky et al. 1998; Socransky and Haffajee 2002; Sbordone and Bortolaia 2003; Lafaurie et al. 2007).

Nas doenças periodontais, o biofilme subgengival, presente nas bolsas periodontais, é constituído de uma grande carga bacteriana renovável, servindo de reservatório para diversas espécies patogênicas orais e não-orais (Li et al. 2000; El-Solh et al. 2004). A anatomia da bolsa periodontal, por exemplo, permite que essa microbiota subgengival esteja em constante proximidade com a microcirculação sanguínea gengival, facilitando a bacteremia e disseminação sistêmica de produtos bacterianos e imunocomplexos a diversos órgãos do organismo. A disseminação de microrganismos orais para dentro da corrente sanguínea é um evento relativamente comum (Li et al. 2000). Em menos de 1 minuto após procedimentos orais, como raspagem e alisamento radicular, exodontias, sondagem periodontal, etc, ou até mesmo escovação dental, microrganismos podem alcançar os capilares sanguíneos periféricos (Forner et al. 2006; Lafaurie et al. 2007), assim como o coração (Padilla et al. 2006) e os pulmões (Yuan et al. 1992). Em situações de saúde oral, esses microrganismos são prontamente eliminados pelo sistema imune. Por outro lado, na presença da doença periodontal crônica, a alta carga de bactérias e seus produtos, bem como de mediadores inflamatórios (Page 1998), são constantemente lançados na circulação sanguínea, podendo contribuir para o desenvolvimento ou agravamento de outras doenças sistêmicas tais como, a endocardite infecciosa (Berbari et al. 1997), osteomielite em crianças (Dodman et al. 2000),

nascimento de crianças prematuras ou com baixo peso (McGaw 2002; Lin et al. 2003; Agueda et al. 2008), doenças cardiovasculares (Deshpande et al. 1998; Brodala et al. 2005; Padilla et al. 2006), acidente vascular encefálico (Joshi 2002; Janket et al. 2003) e pneumonia nosocomial (PN) (Scannapieco et al. 2003; Scannapieco and Rethman 2003).

A pneumonia é uma das infecções mais frequentes, representando de 10% a 15% de todas as infecções nosocomiais. Estas se definem como infecções adquiridas no ambiente hospitalar pelo paciente após 48 horas de sua admissão, sem que a mesma estivesse presente ou latente no momento da internação (Pesola 2004; Paju and Scannapieco 2007). A prevalência da pneumonia nosocomial aumenta drasticamente em pacientes nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), variando de 45% (Vincent 1999) a 68% em usuários de ventilação mecânica (Bowton 1999). Apesar dos recentes avanços no tratamento intensivo e na terapia antimicrobiana, a taxa de mortalidade da pneumonia nosocomial ainda é muito alta, variando de 20% a 55% dos pacientes acometidos (Vincent 1999; Mojon 2002; Lee et al. 2005), podendo chegar a mais de 70% em pacientes com ventilação mecânica. (Bowton 1999; Mori et al. 2006).

Toda pneumonia é genericamente definida como uma inflamação do parênquima pulmonar causada por uma infecção fúngica, viral, parasitária, bacteriana ou mista. A pneumonia bacteriana é a forma mais comum e a mais tratável. A PN difere da pneumonia adquirida na comunidade (PAC) em função das diferenças entre os patógenos relacionados e das medidas preventivas e terapêuticas que devem ser adotadas (Mojon 2002; Scannapieco et al. 2003).

Enquanto a PAC é tipicamente causada por patógenos que residem na mucosa da orofaringe, como por exemplo, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae* e espécies anaeróbicas, a PN é geralmente causada por bactérias que normalmente não colonizam a orofaringe, incluindo espécies como *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, além de bactérias entéricas Gram-negativas como *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. (Scannapieco 1999; Scannapieco et al. 2003).

A via de contaminação pulmonar mais comum é através da colonização do trato respiratório superior por bactérias potencialmente patogênicas que alcançam o trato respiratório inferior por meio da inalação de aerossóis contaminados ou pela aspiração de pequenas quantidades de secreções da orofaringe, as quais contaminam o epitélio das vias aéreas inferiores, alcançando os pulmões (Scannapieco 1999). A ocorrência de aspiração de material das vias aéreas superiores é comum, incidindo em 45% dos casos em indivíduos saudáveis enquanto dormem e em 70% de indivíduos com déficit de consciência. Esses indivíduos geralmente possuem condições que aumentam a propensão para aspiração de produtos da orofaringe. São pacientes com história de Acidente Vascular Cerebral, doença de Parkinson, alcoolismo, demência, epilepsia e usuários de drogas que, devido às condições neurológicas, possuem um mecanismo de respiração e deglutição não sincronizadas (Mojon 2002). A aspiração mais comum é da própria saliva do paciente que pode conter grande quantidade e variedade de espécies bacterianas aeróbicas e anaeróbicas. A diminuição do fluxo salivar e do *pH* da

cavidade oral pode facilitar a colonização por patógenos respiratórios e o aumento na concentração de bactérias na saliva, mostrando uma relação entre xerostomia e o desenvolvimento de pneumonia (Terpenning et al. 1993; Terpenning 2001; Johanson and Dever 2003). A frequência de aspiração da saliva também é elevada em pacientes que fazem uso de sondas nasogástrica e orotraqueal (Estes and Meduri 1995; Broussard and Altschuler 2000; Scannapieco et al. 2001).

Mecanismos foram propostos para explicar como a presença da DP e da higiene oral deficiente podem representar fatores para o desenvolvimento da PN. Alguns estudos indicam que o periodonto e os dentes são reservatórios de patógenos respiratórios, principalmente em indivíduos hospitalizados com DP e má higiene bucal. A carência de higiene ocasiona um aumento na quantidade e complexidade do biofilme que, por sua vez, favorece o estabelecimento e crescimento de patógenos respiratórios nesse habitat (Scannapieco and Mylotte 1996; Scannapieco 1999; Mojon 2002; Scannapieco et al. 2003). Diversos estudos têm reportado a presença de patógenos respiratórios na placa dental, assim como na saliva e língua de pacientes em instituições de saúde (Fourrier et al. 1998; Russell et al. 1999; Abe et al. 2001; Didilescu et al. 2005; Sumi et al. 2006; 2007). Outro mecanismo sugere que bactérias orais podem ser desprendidas ou liberadas do biofilme dental para dentro da cavidade oral, onde são envolvidas pela secreção salivar. A saliva altamente concentrada de bactérias é aspirada para dentro do trato respiratório inferior, podendo ocasionar, então, pneumonia nesses indivíduos (Terpenning 2001; Mojon 2002; Scannapieco et al. 2003).

Uma variedade de espécies orais anaeróbias e facultativas já foi isolada de fluidos pulmonares infectados incluindo, *Actinomyces* spp., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Actinobacillus actinomycetemcomitans*), *Campylobacter gracilis* (*Bacteroides gracilis*), *Clostridium* spp, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella buccae* (*Bacteroides buccae*) e *Prevotella oralis* (*Bacteroides oralis*). Muitas dessas espécies estão associadas à ocorrência da doença periodontal (Scannapieco 1999). No entanto, bactérias aeróbias, tais como os patógenos respiratórios *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, considerados espécies não-orais, podem estar presentes em altas proporções na saliva, biofilme dental e outras regiões da cavidade oral, e com isso ser aspiradas para os pulmões (Bartlett et al. 1974; Zijlstra et al. 1992; Morris and Sewell 1994; Chen et al. 1995; Terpenning 2001; Brennan et al. 2004). Um mecanismo auxiliar neste processo é a ação de enzimas proteolíticas, como elastase e tripsina, associadas com a DP. Elas são liberadas na saliva, podendo modificar a superfície da mucosa orofaríngea e promover adesão e colonização de patógenos respiratórios (Wikstrom and Linde 1986; Childs and Gibbons 1990; Brennan et al. 2004). A mudança na mucosa orofaríngea está associada com a perda de fibronectina das superfícies das células epiteliais. A fibronectina é uma proteína que recobre a mucosa oral e está provavelmente envolvida na ecologia oral, pois possui sítios de adesão para espécies de estreptococos orais, enquanto inibe a adesão de outras bactérias mais patogênicas (Scannapieco 1999; Mojon 2002). A remoção da fibronectina através da ação

degradante das proteases liberadas por bactérias periodontais pode expor receptores para adesinas de patógenos respiratórios (Scannapieco 1999). Tais proteases são derivadas das bactérias e dos leucócitos polimorfonucleares, que entram na saliva a partir do sulco e do fluido gengival. Do mesmo modo, a estimulação constante das células do periodonto (células epiteliais, endoteliais, fibroblastos, macrófagos e leucócitos) pelos patógenos periodontais favorece a colonização de patógenos respiratórios através da liberação de diversas citocinas inflamatórias na saliva (IL-1 α e β , IL-6, IL-8, TNF- α) que, em contato com o epitélio respiratório, modificam a superfície e regulam positivamente a expressão das moléculas de adesão de superfície celular para a colonização bacteriana (Reddi et al. 1996; Wilson et al. 1996).

A função que a DP e biofilme dental desempenham na colonização oral dos patógenos respiratórios ainda não é totalmente conhecida. No entanto, sabe-se que o biofilme favorece a colonização e o crescimento desses microrganismos, tornando-os menos suscetíveis a ação dos antimicrobianos e do sistema imune (Gendron et al. 2000; Smith et al. 2001). A presença de patógenos respiratórios no biofilme dental, tais como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Staphylococcus* spp., *Dialister pneumosintes*, *K. pneumoniae* e *E. coli* é relatada em diversos trabalhos, principalmente em pacientes com DP (Slots et al. 1988; Colombo et al. 1998; Colombo et al. 2002; Souto et al. 2006; Ferraro et al. 2007), indivíduos hospitalizados (Scannapieco et al. 1992; Didilescu et al. 2005; Sumi et al. 2007) e imunocomprometidos (Goncalves Lde et al. 2004; 2007). A *D. pneumosintes* tem sido associada a abscessos cerebrais (Rousee et al. 2002), bacteremia (Pierre Lepargneur et al.

2006) e infecções respiratórias, especialmente pneumonias por ventilação artificial (Bahrani-Mougeot et al. 2007). Esta espécie tem sido reconhecida como patógeno periodontal e está relacionada a sítios com perda de inserção periodontal (Slots et al. 2002), sendo encontrada principalmente no biofilme subgengival (Contreras et al. 2000; Doan et al. 2000; Ghayoumi et al. 2002; Ferraro et al. 2007). Espécies de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* apresentam grande potencial patogênico e são responsáveis por diversas infecções hospitalares devido à sua alta resistência a drogas antimicrobianas (Bergogne-Berezin and Towner 1996; Struelens 1998; Villers et al. 1998; Korcova et al. 2005). Particularmente, as espécies *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* têm sido freqüentemente detectadas em indivíduos com periodontite crônica (Colombo et al. 2002; Souto et al. 2006) e refratária (Slots et al. 1990; Colombo et al. 1998). Essas espécies são altamente prevalentes na placa dental e na saliva de pacientes idosos hospitalizados, especialmente em UTI's, que apresentam higiene oral deficiente (Scannapieco et al. 1992; Fourrier et al. 1998; Scannapieco et al. 1998). Estão associadas ao desenvolvimento de pneumonia nosocomial (Luna and Aruj 2007), principalmente em usuários de ventilação mecânica artificial (Combes et al. 2002; Trouillet et al. 2002), resultante da aspiração de saliva e secreções da orofaringe contendo esses patógenos (Scannapieco 1999; Scannapieco et al. 2003). Outros patógenos associados à infecções respiratórias nosocomiais e que são freqüentemente detectados no biofilme dental incluem espécies de *Staphylococcus*, particularmente as espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo (CNS) e *Staphylococcus aureus* (Smith et al. 2001). Esses microrganismos são

responsáveis por diversas doenças como a artrite reumatóide (Goldenberg 1998), infecções de feridas cirúrgicas (Ross 1985) e pneumonia associada à ventilação artificial (Hunter 2006). Colonizam o biofilme supragengival (Percival et al. 1991), subgengival (Kamma et al. 1999; Colombo et al. 2002; Murdoch et al. 2004; Souto et al. 2006) e saliva (Jackson et al. 1999; Ohara-Nemoto et al. 2008), sendo detectados em alta frequência em pacientes com DP e idosos hospitalizados (Abe et al. 2001; Sumi et al. 2007). A relevância dessas espécies no desenvolvimento de infecções hospitalares se deve ao fato de existirem cepas altamente resistentes a vários tipos de antibióticos. Essas cepas são carreadoras do gene *mecA*, um gene de resistência a múltiplos antibióticos (incluindo beta-lactâmicos e não-beta-lactâmicos) largamente distribuído entre espécies de CNS e *S. aureus*. Esse gene se encontra inserido em uma ilha genômica chamada Staphylococcal Cassete Chromosome mec (*SCCmec*) (Niemeyer et al. 1996; Ito et al. 2004) que é um elemento genético móvel responsável pela troca de genes de resistência entre cepas de *Staphylococcus* (Wielders et al. 2001; Ito et al. 2004; Hanssen and Ericson Sollid 2006).

A cavidade oral é um riquíssimo ecossistema habitado por diversos microrganismos que são responsáveis tanto pela saúde, quanto pelo desenvolvimento de doenças orais (gingivite e periodontites) e sistêmicas (Li et al. 2000; Socransky and Haffajee 2005). Em condições normais o ambiente oral permanece em equilíbrio, mas pode ser alterado pela doença periodontal, pois sua diversidade microbiológica patogênica pode facilitar a colonização do biofilme dental e da saliva por espécies extra-orais, como patógenos

respiratórios, contribuindo para o desenvolvimento de infecções respiratórias, principalmente em idosos e indivíduos hospitalizados (Jenkinson and Lamont 2005). Esses patógenos extra-orais parecem colonizar a cavidade oral (saliva e biofilme dental) numa frequência maior do que se sabia em vários indivíduos. Entretanto, numa situação de doença oral e má higiene oral, essa prevalência aumenta drasticamente, sobretudo em pacientes idosos, hospitalizados ou institucionalizados, geralmente imunocomprometidos (Fourrier et al. 1998). O aumento na prevalência dessas bactérias pode aumentar o risco de desenvolvimento de infecções sistêmicas nesses pacientes. A permanência dos pacientes no ambiente hospitalar por longos períodos de tempo pode influenciar na colonização da cavidade oral por esses patógenos, o que parece aumentar o risco de infecções nosocomiais (Scannapieco et al. 1992). Deve-se salientar que a maioria dos estudos examinam indivíduos idosos que moram em casas de repouso (Abe et al. 2001; Senpuku et al. 2003; El-Solh et al. 2004) ou pacientes doentes em estado grave, internados em UTI (Scannapieco et al. 1992; Fourrier et al. 1998; Mori et al. 2006). É necessário que avalie o grau de colonização da cavidade oral por esses patógenos respiratórios, não somente nestes indivíduos, mas em pacientes hospitalizados que se submetem a cirurgias eletivas, sem que estejam em estado grave de saúde.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como principal objetivo fazer um levantamento epidemiológico da ocorrência de patógenos respiratórios na cavidade oral de indivíduos hospitalizados, submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, nos momentos pré- e pós-operatórios.

Para a realização desta proposta, quatro objetivos específicos foram determinados:

- 1- Determinar a prevalência dos patógenos respiratórios *Acinetobacter* spp., *Dialister pneumosintes*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* em amostras de biofilme dental e saliva dessa população;
- 2- Avaliar a ocorrência do gene *mecA* nas espécies de *Staphylococcus* isolados das amostras de saliva e biofilme dental dessa população;
- 3- Avaliar os parâmetros clínicos periodontais e demográficos da população estudada, associando-os com a prevalência das espécies bacterianas pesquisadas;
- 4- Avaliar mudanças na frequência de colonização dos patógenos respiratórios entre os momentos pré- e pós-operatórios.

3. MANUSCRITO

Critical Care Medicine



Detection of respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalized patients with chronic periodontitis undergoing myocardium revascularization surgery

Journal:	<i>Critical Care Medicine</i>
Manuscript ID:	draft
Manuscript Type:	Original Articles - Clinical Investigations
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Zuanazzi, David; Federal University of Rio de Janeiro, Periodontology Souto, Renata; Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Microbiology, Dep. Medical Microbiology Mattos, Marcelo; Federal University of Rio de Janeiro, Periodontology Zuanazzi, Maura; Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Microbiology, Dep. Medical Microbiology Tura, Bernardo; National Institute of Cardiology, Research Department Sansone, Carmelo; Federal University of Rio de Janeiro, Periodontology Colombo, Ana Paula; Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Microbiology, Dep. Medical Microbiology
Key Words:	nosocomial infections, dental plaque, saliva, respiratory pathogens, periodontal diseases



Detection of respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalized patients with chronic periodontitis undergoing myocardium revascularization surgery

- 1) David Zuanazzi, DDS, MSc; ^a
- 2) Renata Souto, DSc; ^a
- 3) Marcelo Barbosa Accioly Mattos, DDS, MSc; ^a
- 4) Maura Rodrigues Zuanazzi, DVM, MSc; ^a
- 5) Bernardo Rangel Tura. MD, PhD; ^b
- 6) Carmelo Sansone, DDS, DSc; ^a
- 7) Ana Paula Vieira Colombo, DDS, PhD. ^a (Corresponding author)

Address: R. Gal. Dionísio, 60 apt. 604 – Humaitá

CEP: 22271-050 - Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Email: anapaulacolombo@yahoo.com or apcolombo@micro.ufrj.br

^a Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ); ^b National Institute of Cardiology (INC)

Supported in part by Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), UFRJ.

The authors of this study have no financial interests to disclose.

No reprints are requested.

Abstract

Objectives: To determine the prevalence of respiratory pathogens in the oral cavity of hospitalized patients with chronic periodontitis, before and after myocardium revascularization surgery.

Design: A single-center, observational study of saliva and dental plaque samples.

Settings: Hospital room and Intensive Care Unit of a Public Hospital; University Research Laboratory.

Patients: Thirty patients with chronic periodontitis, undergoing cardiac surgery, who required endotracheal intubation for mechanical ventilation.

Interventions: Myocardium revascularization surgery and pre-operative antibiotic prophylaxis.

Measurements and Main Results: Demographic, medical and periodontal parameters were evaluated in all patients before surgery. Sampling of dental plaque and saliva was performed before and after surgery. Respiratory pathogens were detected by PCR and culture. Patients were divided into dentate (DE) and edentulous (ED) according the presence or absence of teeth. Bacterial frequency in saliva in both groups was: *Pseudomonas* spp. (83.3%), *Staphylococcus* spp. (81.5%), *Acinetobacter* spp. (63.6%), *Dialister pneumosintes* (33.3%), and *Pseudomonas aeruginosa* (16.7%). There was a trend for *D. pneumosintes* to be more frequently detected in DE (41.2%) than ED (23.1%) patients. In plaque samples, DE with >14 teeth showed a higher prevalence of *Pseudomonas* spp. (100%) than individuals with ≤14 teeth (69.1; p=0.048). Conversely, *P. aeruginosa* was significantly more prevalent in

subjects with fewer teeth (35.5%) than with >14 teeth (5.7%; $p=0.037$). All staphylococci were CNS, and about 11% were positive for the *mecA* gene. CNS *mecA*-positive showed a tendency to increase in all samples, whereas *P. aeruginosa* reduced after surgery.

Conclusions: The oral cavity of hospitalized patients with chronic periodontitis harbors high frequencies of respiratory pathogens, particularly *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp., supporting its potential role as a reservoir for these species.

KEY WORDS: nosocomial infections; dental plaque; saliva; respiratory pathogens; periodontal diseases

Introduction

Nosocomial infections continue to be major causes of morbidity and mortality among hospitalized patients, especially in the intensive care unit (ICU) (1). Bacterial pneumonia may represent from 13% to 48% of all infections in hospitals and health care institutions (2, 3). This disease is a result of infection of the lower respiratory tract, usually by aspiration of microorganisms colonizing the oropharyngeal area (4). In particular, elderly patients in nursing homes and hospitals have a higher risk of developing respiratory infections due to silent aspiration (5).

The microbial diversity of the human oral cavity has been recognized for decades, and over 700 species have been recently identified in this habitat (6). In addition to the resident oral species, studies have shown that the oral cavity

may harbor “non-oral” bacteria, including various medically important pathogens (7-9). For instance, previous investigations have reported that respiratory pathogens such as *Acinetobacter* spp., *Dialister pneumosintes*, *Pseudomonas* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus* spp., and Coagulase-negative staphylococci (CNS) can colonize dental plaque of hospitalized patients (1, 10). Of interest, colonization frequency seems to increase in individuals presenting poor oral health, significant amounts of dental plaque and/or periodontal diseases (8, 9, 11, 12). Dental plaque may influence the initiation and progression of pneumonia due to translocation of the bacteria from the biofilm to the respiratory tract (2). Saliva may also play a significant role in the development of pneumonia by acting as a vehicle to bacteria residing in the oral cavity, which can be aspirated into the lungs (13). Oral anaerobic bacteria have also been isolated from patients with ventilator-associated pneumonia, reinforcing the role of the oral microbiota in these infections (14).

Considering that the mouth may be a reservoir for nosocomial respiratory pathogens, the purpose of the present investigation was to determine the prevalence of certain species of respiratory pathogens, including *Acinetobacter* spp., *D. pneumosintes*, *Pseudomonas* spp., and *Staphylococcus* spp. in dental biofilm and saliva of hospitalized patients undergoing myocardial revascularization surgery. In addition, associations between the frequency of these organisms and epidemiological parameters, general health and periodontal *status* were investigated.

Materials and Methods

Study population

The study population consisted of hospitalized patients recruited from the Coronary Heart Disease Unit of the National Institute of Cardiology (INC) at Rio de Janeiro, Brazil, between January and August of 2007. All patients were admitted to the hospital to undergo elective myocardial revascularization surgery. Of 97 patients screened, 30 patients (mean age 63.5 ± 1.7 years; 77% males) (Table 1) fulfilled the study criteria and accepted to participate. Exclusion criteria included any inflammatory or infectious disease other than coronary artery or periodontal diseases, as well as any periodontal treatment or use of local or systemic antimicrobial agents within 6 months prior to the entry into the study. Informed consent was obtained from all enrolled individuals. The study protocol was approved by the Review Committee for Human Subjects of the INC.

Oral examination

Demographic and medical history data were obtained from the patient's records. Dental examination included periodontal clinical measurements, performed at six sites per tooth in all teeth except third molars (15), including probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), bleeding on probing (BOP) (16), and dental plaque (DP) (17). After initial clinical evaluation, subjects were categorized into edentulous (ED) or dentate (DE) according to the presence or absence of teeth. DE subjects were divided into two groups based on the number of remaining teeth; i. e. subjects presenting ≤ 14 teeth and >14 teeth

(18). All clinical examination and microbiological sampling were conducted by a single trained examiner.

Sampling

Patients were sampled in two moments: at the pre-operative stage, while they waited for surgery; and after surgery, at the Intensive Care Unit (ICU), within 12 hours after extubation. The intubation occurred in the beginning of the surgery and last no more than 20 hours. Antibiotic prophylaxis was given to all patients according to the hospital standard protocol (1g cefazolin intravenously 20 to 30 min before, and up to 24 hours after surgery) (19). For saliva sampling, patients were not allowed to clean their teeth or to eat 30 min before sampling. They rinsed out their mouths with 10 mL of 0.9% sterile saline for 60 s, and the mouthwashes were collected in sterile plastic recipients (20). Afterwards, supra- and subgingival biofilm samples were obtained from 4-6 mesial sites in different teeth of each dentate subject as follow: first upper molars or the most posterior teeth; and lower right central incisors or the most anterior teeth. Before sampling, the area was dried and isolated with sterile gauze, and supra and subgingival plaque were collected using individual sterile periodontal cures (Gracey n° 9-10 – Hu-Friedy, Chicago, IL.). Each sample was placed in tubes containing 1.5mL of mycoplasma broth (Sigma-Aldrich, USA) with 10 % DMSO (Dimethyl Sulfoxide 100 mg/ml), and stored at -20 °C. All saliva and plaque samples were divided in two equal aliquots: one for extraction of bacterial DNA and the other for cultivation and isolation of *Staphylococcus* spp.

Isolation of *Staphylococcus* spp.

Each sample was inoculated in tryptic soy broth (TSB - Difco™, Sparks, USA) containing 6.5% NaCl, and incubated overnight at 37°C. After growth, 100 µL of the suspension was plated on mannitol salt agar selective media (BBL™, Sparks, USA) and incubated for up to 48h at 37°C. Colonies from each plate were identified initially on the basis of their appearance, Gram stain, catalase and oxidase reactions, and color changes on the selective media. Representative colonies were placed in TSB overnight at 37°C for enrichment. One mL was obtained for bacterial DNA extraction as described below.

Bacterial DNA extraction and detection of *Acinetobacter* spp., *D. pneumosintes*, *Pseudomonas* spp., and *Staphylococcus* spp. by PCR

Bacterial DNA was extracted from saliva and dental biofilm samples using the Mo Bio UltraClean microbial DNA kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA), and stored at -20°C until PCR amplification was performed.

Acinetobacter spp. detection was carried out by a nested PCR. The first amplification used the bacterial 16S rRNA universal primers 27f and 1492r (Table 1). Approximately 100 ng of sample DNA was added to a 50 µL PCR mixture containing 0.5 pmol of each primer (Table 2), 400 µM of each dNTP, 3 mM MgCl₂, PCR Platinum® Taq buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.4], 50 mM KCl), and 1.5 U Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Grand Island, NY). The amplification program included an initial step of 95°C for 5 min followed by 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final step of 72°C for 5 min. The second amplification was performed with the

primers Ac436f and Ac676r (Table 1), in a reaction volume of 50 µL containing 2 pmol of primer Ac436f, 1 pmol of primer Ac676r, 200 µM of each dNTP, 2 mM MgCl₂, PCR Platinum® *Taq* buffer, and 1.5 U Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). A short denaturation step of 95°C for 15 s was followed by 50 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, annealing at 58°C for 10 s, elongation at 74°C for 30 s, and a final extension step of 74°C for 2 min.

Detection of *D. pneumosintes* was carried out in a 25 µL reaction mixture containing 100 ng of DNA template, 2 pmol of each primer (Table 1), 200 µM of each dNTP, 1.6 mM MgCl₂, PCR Platinum® *Taq* buffer, and 1 U Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The amplification included an initial step of 95°C for 2 min, followed by 36 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 1 min, 72°C for 2 min, and a final step of 72°C for 10 min.

A multiplex PCR using two pairs of primers, PS1, PS2, PAL1 and PAL 2 (Table 1), was carried out for detection of *Pseudomonas* spp., including the species *P. aeruginosa*. The PCR was performed in a 100 µl reaction mixture containing 100 ng of DNA, 0.5 pmol of each primer PS1 and PS2, 0.7 pmol of each primer PAL1 and PAL2, 200 µM of each dNTP, 1.7 mM MgCl₂, PCR Platinum® *Taq* buffer, and 2 U Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The amplification reaction included an initial step of 95°C for 2 min followed by 30 cycles of denaturation at 94°C for 40 s, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final step of 72°C for 2 min.

For detection of *Staphylococcus* spp., another multiplex PCR using four pairs of primers (Table 1) was carried out. The PCR reaction was performed in a 100 µl mixture containing 100 ng of DNA extracted from isolates, 1 pmol of each

primer, 200 μ M of each dNTP, 3 mM MgCl₂, PCR Platinum® *Taq* buffer and 2.5 U Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The amplification included an initial step of 94 °C for 3 min followed by 36 cycles of denaturation at 94°C for 1.5 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final step of 72°C for 10 min.

All PCR amplifications took place in a thermocycler (Primus 25/96, MWG-Biotech-INC, High Point, NC, USA). The amplicons were analyzed on a 1.5% agarose gel electrophoresis stained with 0.5 mg/mL ethidium bromide, and visualized on a UV transilluminator. A 1 kb DNA ladder digest (LifeTechnologies, Gaithersburg, MD) was used as a standard molecular weight. Positive controls included DNA extracted from the reference strains *Acinetobacter baumannii* (ATCC 19606), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *D. pneumosintes* (ATCC 33048), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 14579) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Statistical analysis

All statistical tests were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc. v.15 Chicago, IL, USA). In the DE patients, full-mouth clinical measurements were computed for each subject and then average across subjects within the groups. Differences on clinical parameters between groups were sought using Mann–Whitney and χ^2 -tests. The frequency of detection of all bacteria was computed for each subject, and significant differences between groups were sought using the Mann-Whitney, χ^2 and Fisher's exact tests. Differences in prevalence of bacteria before and after surgery within groups were tested by McNemar or Wilcoxon tests. Associations

between clinical and microbiological parameters were examined by Spearman correlation analysis. Any difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Clinical and demographic parameters

Table 2 shows the demographic features of the 30 subjects separated into two groups according to presence (DE) or absence of teeth (ED). This population was comprised mainly of males, over 45 years of age, with history of hypertension. Approximately 26% of the individuals were diabetic. No significant differences between groups were found for these parameters (χ^2 test). The DE group was further divided into two groups, according to number of remaining teeth. The demographic and full-mouth periodontal clinical parameters of dentate subjects are shown in table 3. All patients presented chronic periodontal disease. Subjects with ≤ 14 teeth presented significantly more loss of clinical attachment, BOP and visible DP than subjects with more than 14 teeth ($p < 0.05$; Mann-Whitney test). However, no significant differences were found for demographic features.

Microbiological data

Saliva samples

Table 4 shows the frequency of all tested bacteria in saliva samples from DE and ED patients. Overall, the most prevalent bacteria in saliva samples at baseline (pre-operative stage) were *Pseudomonas* spp. (83.3%), CNS (81.5%)

and *Acinetobacter* spp. (63.3%). All *Staphylococcus* spp. cultivated were CNS, and *S. aureus* was not detected in any sample. No significant differences in the frequency of bacteria between DE and ED were seen at pre-surgery; however, *D. pneumosintes* showed a tendency to be more prevalent in DE than ED patients ($p = 0.051$; Fisher's Exact Test). After surgery, the number of patients sampled decreased due to inappropriate time of extubation, or refusal of the patient in participating in the study. The prevalence of CNS, particularly carrying *mecA* gene, seemed to increase, whereas *P. aeruginosa* had a marked decrease in all patients. *Acinetobacter* spp. and *D. pneumosintes* showed a trend to reduce, and *Pseudomonas* spp. to increase in frequency in ED subjects. However, no significant changes in the prevalence of any tested bacteria were found between baseline and post-surgery in both groups (Wilcoxon test).

Plaque samples

The mean frequency of all tested bacteria in biofilm samples of dentate individuals with high (> 14) and low number of teeth (≤ 14) is depicted in figure 1. At pre- and post-surgery, the most prevalent bacteria in all patients were *Pseudomonas* spp. ($\pm 37\%$) CNS ($66.2 \pm 34\%$) and *Acinetobacter* spp. ($67.2 \pm 33\%$). *Pseudomonas* spp. was the only group of microorganisms that occurred significantly more often in subjects with > 14 teeth (100%) than subjects with ≤ 14 teeth ($69.1 \pm 12\%$; $p = 0.048$) Conversely, *P. aeruginosa* was significantly more prevalent in subjects with fewer teeth ($35.5 \pm 9.3\%$) compared to the ones with > 14 teeth ($5.7 \pm 5.7\%$; $p = 0.037$; Mann-Whitney test). At post-surgery,

similar distributions of the bacteria were observed between dentate subgroups, except for *D. pneumosintes* which was slightly more prevalent in subjects with ≤ 14 teeth (Figure 1). Regarding changes after surgery, *Acinetobacter* spp., *D. pneumosintes* and CNS showed a tendency to increase in prevalence in dentate patients with fewer teeth. Likewise, the frequency of CNS isolates carrying the *mecA* gene seemed to increase in this group. Although the frequency of *Pseudomonas* spp. did not change very much after surgery, *P. aeruginosa* had a marked decrease from 35.5% to 5.7% in subjects with ≤ 14 teeth. Nevertheless, none of these changes reached statistical significance ($p > 0.05$; Wilcoxon signed rank test).

A strong association between the presence of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. was found, after controlling for gender, smoking, age, and number of teeth ($\rho = 0.886$, $p < 0.02$). Detection of *Staphylococcus* spp. correlated strongly with the presence of *P. aeruginosa* ($\rho = 0.962$, $p < 0.002$), and modestly with BOP ($\rho = 0.317$, $p < 0.013$). On the other hand, increase in supragingival plaque accumulation correlated with lower prevalence of *P. aeruginosa* ($\rho = -0.859$, $p < 0.03$) and *mecA Staphylococcus* spp. ($\rho = -0.443$, $p < 0.01$), after controlling for the variables cited above. When comparing saliva and dental plaque samples for the prevalence of the tested bacteria, *Staphylococcus* spp. were isolated significantly more often from saliva (81.5%) than plaque (56.5%; $p = 0.03$, Fisher's exact test). All *Staphylococcus* isolates were CNS. No significant associations were observed between supra and subgingival plaque for any of the species examined.

Discussion

The current investigation determined the prevalence of respiratory pathogens in dental biofilm and saliva of hospitalized patients with chronic periodontitis undergoing myocardium revascularization surgery, before and after endotracheal intubation. At baseline, microbiological examination of saliva and dental plaque samples demonstrated a high prevalence of respiratory pathogens, particularly *Pseudomonas* spp., CNS and *Acinetobacter* spp., corroborating the findings reported by other investigators (Scannapieco et al. 1992; Fourrier et al. 1998; Abe et al. 2001; Sumi et al. 2002; Senpuku et al. 2003; Didilescu et al. 2005; Sumi et al. 2006). Nevertheless, we observed greater frequency rates of these species in comparison to those studies. For instance, Senpuku et al. (27) isolated *Pseudomonas* spp. from dental plaque of 22.6% elderly subjects with heart disease residing in nursing home, whereas Didilescu et al. (10) found a prevalence of 38% for *P. aeruginosa* and 44% for *A. baumannii* in hospitalized chronic lung disease patients. One plausible explanation for these differences could be the high full-mouth prevalence of sites with visible plaque (81.5 ± 18) found in our population (data not shown). Although most studies reported high dental plaque scores, many of them used simplified plaque indexes or measured a few teeth (1, 10, 26, 31). It should also be pointed out that we sampled supra and subgingival plaque in contrast to those investigations that sampled only supragingival plaque. Another important aspect in our study was the evaluation of the population periodontal status. Most of our patients presented moderate chronic periodontal disease, with a high frequency of sites with periodontal attachment loss, dental plaque

accumulation and inflammation (BOP) (Table 3). Little information about the periodontal conditions of the patients is provided in studies analyzing respiratory pathogens in the oral cavity. However, the association between respiratory pathogens and periodontal diseases has been reported by our group, as well as other investigators (7, 9, 32-36). The elevated frequency of these pathogens in patients with periodontitis suggests that the presence of a complex subgingival microbiota together with the chronic inflammatory process may provide a favorable environment for the establishment of these microorganisms. Of interest, Gonçalves et al. (12) have shown that some of these opportunistic pathogens are more prevalent in subgingival plaque of HIV-infected than non-infected patients with chronic periodontitis, probably due to the constant use of antimicrobial agents, and persistent immunosuppression in those patients. Utilization of distinct methods for identification of microorganisms may also account for differences in the recovery rate of respiratory pathogens from the oral cavity reported in various studies. For instance, the use of cultural methods may result in lower rates of detection compared to molecular techniques such as PCR and DNA hybridization (37).

In saliva samples, no major differences were found between DE and ED patients, but *D. pneumosintes* showed a tendency to be more prevalent in DE subjects. Moreover, this species was slightly more frequent in DE subjects with > 14 teeth. These findings suggest that the presence of teeth may favor colonization by this anaerobic microorganism. In fact, Ferraro et al. (8) detected *D. pneumosintes* mainly in subgingival biofilm rather than saliva samples from periodontitis and healthy patients. *D. pneumosintes* was first isolated from

nasopharyngeal secretions of patients during the flu epidemic of 1918–1921 (38). More recently, it has been found in the oral cavity and bronchoalveolar lavage (BAL) samples from subjects with ventilator-associated pneumonia (VAP) (31). Strong evidence has suggested that this microorganism may also be a new putative periodontal pathogen (8, 23, 39, 40).

Although the role of *Staphylococcus* spp. in the ecology of the oral flora is controversial, their occurrence is unquestionable. A number of investigations have reported frequencies ranging from 83% to 100% of *Staphylococcus* spp. in the oral cavity of both healthy adults and elderly individuals (41). On the other hand, the prevalence of these species in hospitalized subjects is variable. According to Sumi's reports, *Staphylococcus* spp. were detected approximately in 30% of elderly individuals (28-30), whereas Abe et al. (26) identified *Staphylococcus* spp. in 37% of the patients. Conversely, we found higher frequencies for *Staphylococcus* spp., especially CNS, in saliva (81.5%) and in plaque (62%) samples from our population. Likewise, Pace et al. (42) isolated *Staphylococcus* spp. from saliva of 74% dentate and 75% edentulous subjects. Surprisingly, *S. aureus* was not detected in any of our patients. Possible reasons for the non-detection of *S. aureus* could be the number of subjects or samples assessed, as well as the methodology employed. On the other hand, CNS have emerged as major pathogens associated with nosocomial infections, including post-cardiac surgery infections (43, 44). Regardless of the species, the major concern for treating staphylococci nosocomial infections is related to the continued emergence of multi-drug resistant strains. These species can carry the *mecA* gene, which is the primary determinant of oxacillin-resistance in

both *S. aureus* and CNS species (45). In the current study, CNS carrying the *mecA* were isolated from 15% of saliva and 11.4% of plaque samples. However, these strains showed a slightly greater prevalence in dentate subjects with > 14 teeth (Table 4, Figure 1). Similarly, Abe et al. (26) isolated *mecA*-positive *S. aureus* in gargled samples of 15% of elderly subjects requiring daily nursing care.

Despite the high frequency of *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa* was detected in 20% of saliva and 24.6% of plaque samples. A significantly higher prevalence of this species was found in DE patients with fewer teeth (35.5%) in comparison to patients with >14 teeth (8.3%). Using cultivation methods, some studies showed lower detection rates for *P. aeruginosa* (5 to 12%) in institutionalized or hospitalized elderly patients (26, 27, 32, 33). On the other hand, Didilescu et al. (10) reported a high frequency of this species in plaque samples (38.2%) of hospitalized patients with chronic lung disease by the checkerboard DNA-DNA hybridization technique. Not only *P. aeruginosa* but also other species of *Pseudomonas* such as *P. cepacia*, *P. putida* and *P. fluorescens* may play a role in episodes of nosocomial infections (46, 47). Recently, *P. fluorescens* was detected in tongue and BAL samples of subjects with VAP (31), corroborating our findings that the oral cavity can harbor different *Pseudomonas* spp. other than *P. aeruginosa*.

As observed in several other reports (1, 10, 30), *Acinetobacter* spp. were also detected quite frequently in dental plaque (59%) and saliva (63.6%) of our patients. These species are ubiquitous, free living, small aerobic Gram-negative cocco-bacilli, considered major nosocomial pathogens (48). *A. baumannii*

accounts for about 80% of reported infections. This species has been detected in the subgingival biofilm of individuals with chronic periodontitis, as well as periodontal health (7, 9). In particular, this species has been associated with treatment failure observed in patients with refractory periodontitis (49), probably due to its high rates of resistance to many commonly prescribed broad-spectrum antibiotics (50). A very strong positive association between the presence of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in the oral cavity was found in the present investigation. Previous studies have indicated that species of *Acinetobacter* and *Pseudomonas* may cooperatively interact with each other, exhibiting direct metabolic communications when they are inserted in highly organized mixed communities (51, 52). Besides, those species are capable of frequent genetic exchanges of multi-drug-resistant genes due to the close evolutionary proximity (53).

After surgery, a second sampling was performed in order to evaluate possible changes in oral colonization by these respiratory pathogens. There was a reduction in the number of subjects and samples evaluated at this second moment, mainly because of the difficult in sampling the patients in the ICU, lack of cooperation or refusal to participate. Thus, these results should be interpreted cautiously. No significant changes were observed for any bacteria from first to second sampling. Overall, there was a trend for these pathogens to increase more in frequency in dental plaque samples compared to saliva. Detection rates of *Staphylococcus* spp., in particular CNS carrying the *mecA* gene increased, whereas *P. aeruginosa* reduced in saliva and plaque samples after surgery. For the other organisms, there was not a pattern of shifts in

colonization after surgery. Increasing in colonization by respiratory pathogens during hospitalization has been reported in other studies (1, 10). Nevertheless, these studies usually evaluated patients hospitalized for long periods of time in the ICUs. In our study, the second sampling was carried out within 12 h after extubation. Furthermore, only the second sampling took place in the ICU, while the first one was done in the pre-operative hospital room. Changes in the prevalence of different species over time may have also been influenced by prophylactic use of broad-spectrum antibiotics before surgery. However, no remarkable changes in the frequency of respiratory species in dental plaque or saliva were observed after antibiotic administration in our study population. Conceivably, established pathogens in dental biofilm may be more difficult to eradicate due to their higher resistance to antimicrobials (54).

In summary, hospitalized patients undergoing myocardial surgery, and presenting chronic periodontitis harbor high frequencies of pathogens associated with nosocomial respiratory infections, particularly *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus* spp. These data suggest that the oral cavity may be a reservoir for these species, increasing the risk for nosocomial pneumonia in susceptible individuals.

Acknowledgements

This work was supported in part by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), and Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil.

References

1. Fourrier F, Duvivier B, Boutigny H, et al. Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. *Crit Care Med* 1998;26(2):301-308.
2. Paju S, Scannapieco FA. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis* 2007;13(6):508-512.
3. Terpenning MS, Taylor GW, Lopatin DE, et al. Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc* 2001;49(5):557-563.
4. van Uffelen R, van Saene HK, Fidler V, et al. Oropharyngeal flora as a source of bacteria colonizing the lower airways in patients on artificial ventilation. *Intensive Care Med* 1984;10(5):233-237.
5. Kikuchi R, Watabe N, Konno T, et al. High incidence of silent aspiration in elderly patients with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(1):251-253.
6. Paster BJ, Olsen I, Aas JA, et al. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* 2006;42:80-87.
7. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002;73(4):360-369.

8. Ferraro CT, Gornic C, Barbosa AS, et al. Detection of *Dialister pneumosintes* in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease. *Anaerobe* 2007;13(5-6):244-248.
9. Souto R, Andrade AFBd, Uzeda M, et al. Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Brazilian Journal of Microbiology* 2006;37:208-215.
10. Didilescu AC, Skaug N, Marica C, et al. Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases. *Clin Oral Investig* 2005;9(3):141-147.
11. Scannapieco FA, Stewart EM, Mylotte JM. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med* 1992;20(6):740-745.
12. Goncalves Lde S, Soares Ferreira SM, Souza CO, et al. 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(1):87-96.
13. Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 1999;70(7):793-802.
14. Dore P, Robert R, Grollier G, et al. Incidence of anaerobes in ventilator-associated pneumonia with use of a protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(4 Pt 1):1292-1298.

15. Haffajee AD, Socransky SS, Goodson JM. Comparison of different data analyses for detecting changes in attachment level. *J Clin Periodontol* 1983;10(3):298-310.
16. Ainamo J, Bay I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. *Int Dent J* 1975;25(4):229-235.
17. Silness J, Loe H. Periodontal Disease in Pregnancy. II. Correlation between Oral Hygiene and Periodontal Condition. *Acta Odontol Scand* 1964;22:121-135.
18. van der Velden U. Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontol 2000* 2005;39:13-21.
19. Classen DC, Evans RS, Pestotnik SL, et al. The timing of prophylactic administration of antibiotics and the risk of surgical-wound infection. *N Engl J Med* 1992;326(5):281-286.
20. Laine ML, Farre MA, Crusius JB, et al. The mouthwash: a non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J Periodontol* 2000;71(8):1315-1318.
21. Broderick NA, Raffa KF, Goodman RM, et al. Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl Environ Microbiol* 2004;70(1):293-300.
22. Vanbroekhoven K, Ryngaert A, Wattiau P, et al. Acinetobacter diversity in environmental samples assessed by 16S rRNA gene PCR-DGGE fingerprinting. *FEMS Microbiology Ecology* 2004;50(1):37-50.

23. Doan N, Contreras A, Flynn J, et al. Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *J Clin Microbiol* 2000;38(8):3043-3047.
24. De Vos D, Lim A, Jr., Pirnay JP, et al. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1295-1299.
25. Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, et al. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3332-3338.
26. Abe S, Ishihara K, Okuda K. Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care. *Arch Gerontol Geriatr* 2001;32(1):45-55.
27. Senpuku H, Sogame A, Inoshita E, et al. Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology* 2003;49(5):301-309.
28. Sumi Y, Miura H, Nagaya M, et al. Colonisation on the tongue surface by respiratory pathogens in residents of a nursing home--a pilot study. *Gerodontology* 2006;23(1):55-59.
29. Sumi Y, Miura H, Sunakawa M, et al. Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Gerodontology* 2002;19(1):25-29.

30. Sumi Y, Miura H, Michiwaki Y, et al. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Arch Gerontol Geriatr* 2007;44(2):119-124.
31. Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, et al. Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia. *J Clin Microbiol* 2007;45(5):1588-1593.
32. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3(2):47-52.
33. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5(3):149-154.
34. Hayes C, Sparrow D, Cohen M, et al. The association between alveolar bone loss and pulmonary function: the VA Dental Longitudinal Study. *Ann Periodontol* 1998;3(1):257-261.
35. Scannapieco FA, Ho AW. Potential associations between chronic respiratory disease and periodontal disease: analysis of National Health and Nutrition Examination Survey III. *J Periodontol* 2001;72(1):50-56.
36. Barbosa FC, Mayer MP, Saba-Chujfi E, et al. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16(5):306-310.

37. Boutaga K, van Winkelhoff AJ, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005;45(2):191-199.
38. Olitsky PK, Gates FL. Experimental studies of the nasopharyngeal secretions from influenza patients: IV. Anaerobic cultivation. *J Exp Med* 1921;33(6):713-729.
39. Ghayoumi N, Chen C, Slots J. Dialister pneumosintes, a new putative periodontal pathogen. *J Periodontal Res* 2002;37(1):75-78.
40. Gomes SC, Piccinin FB, Oppermann RV, et al. Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol* 2006;77(9):1483-1490.
41. Ohara-Nemoto Y, Haraga H, Kimura S, et al. Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. *J Med Microbiol* 2008;57(1):95-99.
42. Pace MA, Watanabe E, Facetto MP, et al. Staphylococcus spp. in the saliva of patients with orotracheal intubation. *Revista Panamericana de Infectologia* 2008;10(2):8-12.
43. Tegnell A, Saeedi B, Isaksson B, et al. A clone of coagulase-negative staphylococci among patients with post-cardiac surgery infections. *J Hosp Infect* 2002;52(1):37-42.

44. Lang S, Livesley MA, Lambert PA, et al. The genomic diversity of coagulase-negative staphylococci associated with nosocomial infections. *J Hosp Infect* 1999;43(3):187-193.
45. Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;46(1):8-20.
46. Anderson DJ, Kuhns JS, Vasil ML, et al. DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis and ribotyping to distinguish *Pseudomonas cepacia* isolates from a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* 1991;29(3):648-649.
47. Bogaerts P, Huang TD, Rodriguez-Villalobos H, et al. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas putida* isolates producing VIM-2 and VIM-4 metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(3):749-751.
48. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 1996;9(2):148-165.
49. Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, et al. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):169-180.
50. Karlowsky JA, Draghi DC, Jones ME, et al. Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(5):1681-1688.

51. Moller S, Sternberg C, Andersen JB, et al. In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol* 1998;64(2):721-732.
52. Hansen SK, Haagensen JA, Gjermansen M, et al. Characterization of a *Pseudomonas putida* rough variant evolved in a mixed-species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6. *J Bacteriol* 2007;189(13):4932-4943.
53. Fournier PE, Vallenet D, Barbe V, et al. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2006;2(1):e7.
54. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol* 2001;50(11):940-946.

Table 1. PCR primer sequences selected for detection of respiratory pathogens.

Species	Sequence	Amplicon (bp)	Reference
<i>Acinetobacter spp.</i>	Eubacterial 16S rRNA 27f: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' 1492r: 5'-TAC GGC TAC CTT GTT ACG ACT T-3'	1450	(21)
	Ac436f: 5'-TTT AAG CGA GGA GGA GG-3' Ac676r: 5'-ATT CTA CCA TCC TCT CCC-3'	280	(22)
	<i>D. pneumosintes</i> 160f: 5'-TTC TAA GCA TCG CAT GGT GC-3' 1265r: 5'- GAT TTC GCT TCT CTT TGT TG-3'	1105	(23)
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>oprI</i> PS1: 5'-ATG AAC AAC GTT CTG AAA TTC TCT GCT-3' PS2: 5'-CTT GCG GCT GGC TTT TTC CAG-3'	249	(24)
	<i>oprL</i> PAL1: 5'-ATG GAA ATG CTG AAA TTC GGC-3' PAL2: 5'-CTT CTT CAG CTC GAC GCG ACG-3'	504	
<i>Staphylococcus spp.</i>	Staphylococcal 16S rRNA 5'-CCT ATA AGA CTG GGA TAA CTT CGG G-3' 5'-CTT TGA GTT TCA ACC TTG CGG TCG- 3'	791	(25)
	<i>clfA</i> de <i>S. aureus</i> 5'-GCA AAA TCC AGC ACA ACA GGA AAC GA-3' 5'- CTT GAT CTC CAG CCA TAA TTG GTG G- 3'	638	
	Eubacterial 16S rRNA 5'-AAC TGG AGG AAG GTG GGG GAT-3' 5'- AGG AGG TGA TCC AAC CGC A- 3'	371	
	gene <i>mecA</i> 5'-TCC AGG AAT GCA GAA AGA CCA AAG C-3' 5'- GAC ACG ATA GCC ATC TTC ATG TTG G- 3'	499	

Table 2 Demographic parameters of the study population.

Parameters ^a	Edentulous	Dentate	Total
	N=13	N=17	N=30
Age (mean \pm SEM) in years	66.2 \pm 2.6	61.3 \pm 2.3	63.5 \pm 1.7
Males (%)	76.9	76.5	76.7
Smoking (%)			
Smoker	38.5	29.4	33.3
Non-smoker	38.5	29.4	33.3
Former smoker	23.1	41.2	33.3
Hypertension (%)	92.3	76.5	83.3
Diabetes (%)			
Type I	0	5.9	3.3
Type II	23.1	23.5	23.3
Non-diabetic	76.9	70.6	73.3

^a No statistically significant differences between groups were observed; χ^2 test.

Table 3 – Clinical and demographic features of dentate subjects.

Parameters	≤ 14 teeth	> 14 teeth	Total
	N=10	N=7	N=17
Age (mean ± SEM) in years	63.5 ± 2.8	58.3 ± 3.7	61.3 ± 2.3
Number of teeth (mean ± SEM) ^b	6.7 ± 1.3	22.5 ± 1.5	13.2 ± 2.1
Males (%)	70	85.7	76.5
Smoking (%)			
Smoker	30	28.6	29.4
Non-smoker	30	28.6	29.4
Former smoker	40	42.8	41.2
Hypertension (%)	80	71.4	76.5
Diabetes (%)			
Type I	0	14.3	5.9
Type II	40	0	23.5
Non-diabetic	60	85.7	70.6
Mean (± SEM)			
PD (mm)	3.0 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.9 ± 0.1
CAL (mm) ^b	5.1 ± 0.4	3.7 ± 0.3	4.5 ± 0.3
Mean % of sites (± SEM)			
PD 1-3mm	88.1 ± 2.9	92 ± 2.4	89.7 ± 1.9
PD 4-6mm	10.3 ± 2.7	6.9 ± 2.3	8.9 ± 1.8
PD >6mm	1.5 ± 1.1	1.03 ± 0.6	1.3 ± 0.6
CAL 1-3mm ^b	47.6 ± 8.5	75 ± 6.5	58.9 ± 6.5
CAL 4-6mm	29 ± 5.8	20.3 ± 4.6	25.5 ± 3.9
CAL >6mm ^b	23.3 ± 6.1	4.6 ± 2.1	15.6 ± 4.2
BOP ^b	58.8 ± 10.4	25.5 ± 4.7	45.1 ± 7.5
DP ^c			
score 1	48.2 ± 3.6	58.2 ± 6.4	52.4 ± 3.5
score 2 ^b	29.7 ± 5.2	10.8 ± 3.2	21.9 ± 4
score 3	10.5 ± 4.3	2.4 ± 1.2	7.1 ± 2.7

PD: pocket depth; CAL: clinical attachment level; BOP: bleeding on probing; DP: dental plaque. ^b Refers to significant differences between groups (p < 0.05; Mann-Whitney test); ^c Refers to Silness and Løe plaque index.

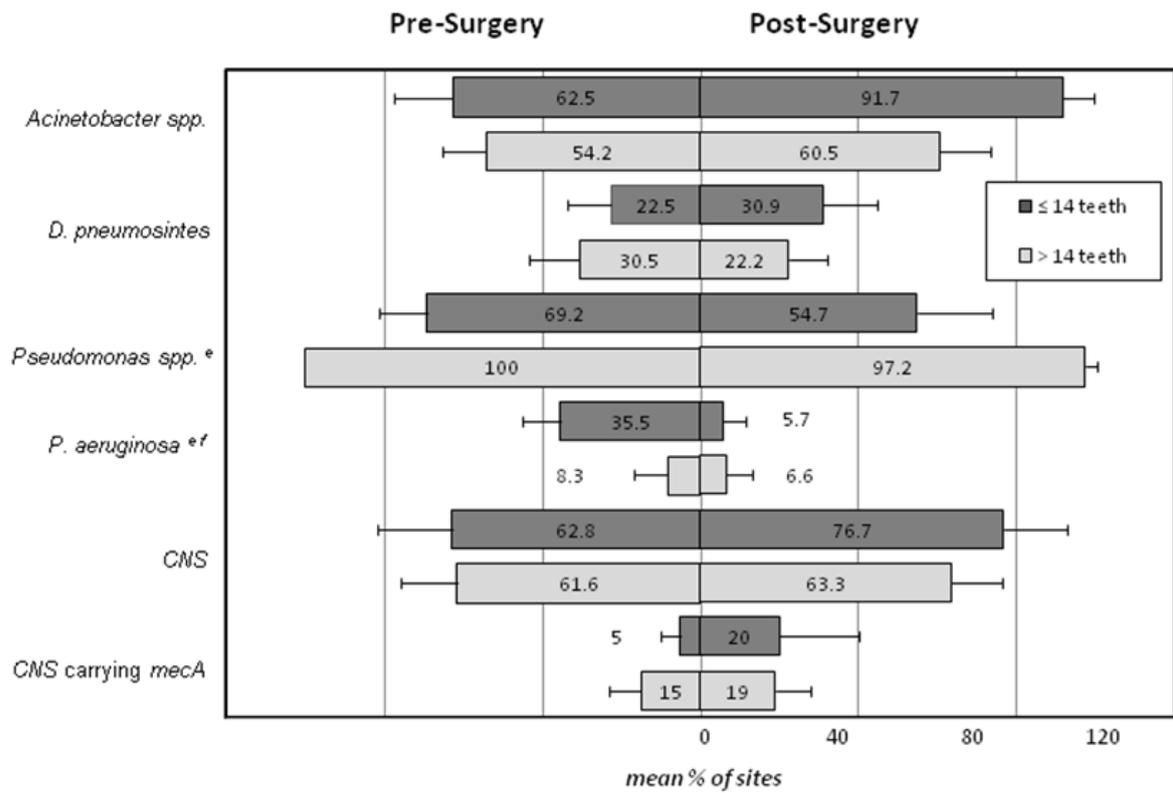
Table 4- Frequency (%) of detection of respiratory pathogens in saliva samples of all subjects before (pre) and after surgery (post).

Parameters	Saliva					
	Edentulous		Dentate		Total	
	Pre N=13	Post N=7	Pre N=17	Post N=13	Pre N=30	Post N=20
<i>D. pneumosintes</i>	23.1	0	41.2	46.2	33.3	30
<i>Acinetobacter spp.</i>	80	40	50	44.4	63.6	42.9
<i>Pseudomonas spp.</i>	84.6	100	82.4	76.9	83.3	84.2
<i>P. aeruginosa</i>	18.2	0	21.4	10	20	6.3
CNS	83.3	100	80	84.6	81.5	89.9
CNS carrying <i>mecA</i>	11.1	25	18.2	20	15	21.4

CNS: all *Staphylococcus* spp. isolated were coagulase-negative staphylococci.

Figure legend

Figure 1 – Mean frequency (\pm SEM) of respiratory pathogens in plaque samples of dentate patients with 14 or > 14 teeth, before and after surgery. ^e Significant difference between dentate subgroups at pre-surgery time point ($p < 0.05$; Mann-Whitney test). ^f Prevalence of *P. aeruginosa* within *Pseudomonas* spp. positive samples.



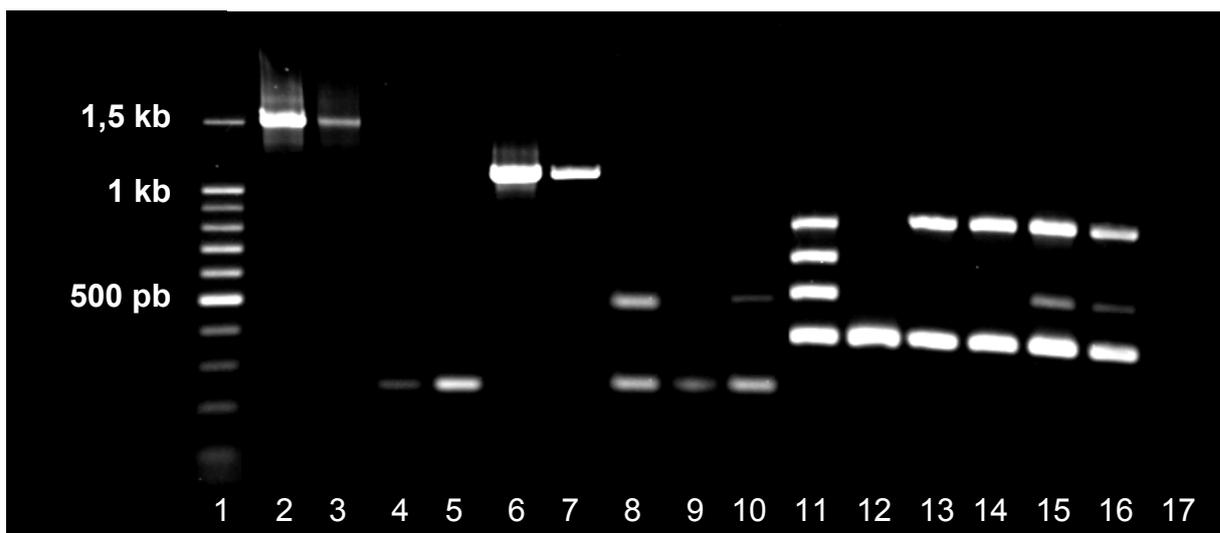


Figura 2. Produtos de amplificação no gel de agarose a 1,5% contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para iniciador universal do 16S bacteriano, *Acinetobacter* spp, *D. pneumosintes*, *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., CNS e gene *mecA*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo 16S bacteriano; 3- amostra positiva para 16S bacteriano; 4- controle positivo para *Acinetobacter* spp. (*A. baumannii*, ATCC 19606), 5- amostra positiva para *Acinetobacter* spp.; 6- controle positivo para *D. pneumosintes* (ATCC 33048); 7- amostra positiva para *D. pneumosintes*; 8- controle positivo para *P. aeruginosa* ATCC 27853; 9- amostra positiva para *Pseudomonas* spp.; 10- amostra positiva para *P. aeruginosa*; 11- controle positivo com DNA de MRSA USA 100; 12- amostra positiva para 16S bacteriano; 13- controle positivo com DNA de *S. epidermidis* (ATCC 14579); 14- amostra positiva para CNS; 15- controle positivo para CNS com gene *mecA*; 16- amostra positiva para CNS com gene *mecA*; 17- controle negativo.

4. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a cavidade oral tem sido reconhecida como um potencial reservatório de bactérias patogênicas associadas a diversas doenças sistêmicas, principalmente infecções nosocomiais como a pneumonia, cujos indivíduos mais acometidos são os idosos (Scannapieco et al. 1992; Fourrier et al. 1998; Terpenning et al. 2001). Em particular, a presença da doença periodontal e o grau de higiene oral nesses indivíduos parecem favorecer a colonização por esses patógenos de importância médica. O biofilme dental pode servir como um reservatório para essas espécies, pois proporciona um ambiente favorável para seu estabelecimento e sobrevivência (Li et al. 2000). Essas bactérias podem se desprender do biofilme dental para dentro da cavidade oral e, por sua vez, podem ser envolvidas pela saliva que serve como um veículo para a entrada e contaminação do trato respiratório, sobretudo em pacientes idosos hospitalizados (Terpenning et al. 2001). Portanto, a população avaliada no presente estudo foi constituída, principalmente, por idosos (idade média de 63 anos) que foram internados e submetidos somente à cirurgia de revascularização do miocárdio. A escolha específica desse tipo de pacientes foi devido ao tipo de cirurgia ser rotineira e de curta duração – com o intuito de padronizar o tempo cirúrgico e de intubação orotraqueal a fim de não ser a causa de uma possível mudança na colonização oral dos pacientes após serem entubados – e porque os pacientes não utilizaram nenhum tipo de protocolo de controle de placa dental, seja química ou mecânica, no pré- e pós-operatórios. Assim, o presente estudo avaliou a prevalência de patógenos respiratórios específicos (*Acinetobacter* spp., *D. pneumosintes*, *Pseudomonas*

spp., *P. aeruginosa* e CNS) em amostras de biofilme dental e saliva desses pacientes, nos períodos pré- e pós-operatórios. Dentre as bactérias pesquisadas, *Pseudomonas* spp., CNS e *Acinetobacter* spp. foram detectadas em alta prevalência na cavidade oral desses pacientes. Outros estudos apresentaram resultados similares, nos quais as espécies *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* spp. e *A. baumannii* foram mais prevalentes em pacientes hospitalizados quando comparados com pacientes de ambulatório e/ou saudáveis (Abe et al. 2001; Sumi et al. 2002, 2006, 2007; Senpuku et al. 2003; Didilescu et al. 2005). Entretanto, no presente estudo, a frequência de colonização bacteriana na saliva e biofilme dental nos pacientes foi maior comparado com estes estudos. Por exemplo, Senpuku e colaboradores (2003) isolaram *Pseudomonas* spp. de amostras de placa dental em 22,6% de pacientes idosos portadores de cardiopatias, residentes de casa de repouso, enquanto que Didilescu et al. (2005) reportaram uma prevalência de 38% de *P. aeruginosa* e 44% de *A. baumannii* em pacientes hospitalizados com doença pulmonar crônica. Uma explicação plausível para essas diferenças pode ser a alta prevalência de sítios que apresentaram placa visível ($81,5 \pm 18$) encontrada na população estudada. Deve-se também mencionar que no presente estudo foram coletadas amostras de placa dental supra e subgingivais, diferente destes estudos que coletaram somente amostras de placa supragengival. Outro importante aspecto foi a avaliação clínica periodontal realizada nos pacientes do presente estudo. A maioria dos pacientes possuía doença periodontal crônica moderada, com uma alta frequência de sítios com perda de inserção periodontal, acúmulo de placa

dental e sangramento à sondagem. Embora a maioria dos trabalhos relata elevados índices de placa dental, muitos destes utilizam índices de mensuração de placa simplificados ou examinam poucos dentes, não realizando exame de boca toda (Fourrier et al. 1998; Abe et al. 2001; Didilescu et al. 2005; Bahrani-Mougeot et al. 2007). Pouca informação sobre as condições periodontais dos pacientes é reportada nestes estudos. Apesar disso, diversos autores têm buscado mostrar uma associação entre a doença periodontal e a colonização oral por patógenos respiratórios (Slots et al. 1988, 1990; Hayes et al. 1998; Barbosa et al. 2001; Scannapieco and Ho 2001; Colombo et al. 2002; Souto et al. 2006). Estes autores sugerem que a elevada frequência desses patógenos em pacientes hospitalizados com periodontite é associada à presença de uma microbiota subgengival complexa aliada com o processo inflamatório crônico periodontal, a qual fornece um ambiente favorável para o estabelecimento desses microrganismos. Entretanto, no presente estudo não foi encontrada nenhuma correlação entre os parâmetros clínicos periodontais dos pacientes e a colonização dos patógenos respiratórios no biofilme dental e na saliva, devido ao pequeno número de pacientes e amostras analisados.

Embora o papel que várias espécies de *Staphylococcus* desempenham na ecologia da microbiota oral não seja completamente compreendida, sua ocorrência na cavidade oral é indiscutível (Jackson et al. 1999). Alguns pesquisadores relatam frequências variando entre 83% a 100% de *Staphylococcus* spp. na cavidade oral de adultos e idosos saudáveis. No estudo conduzido por Jackson e colaboradores (1999), esses microrganismos

foram isolados da língua e saliva de adultos (94%) e idosos saudáveis (100%), e as espécies de CNS foram detectadas em 92% dos adultos. Resultados similares foram obtidos recentemente no Japão onde essas bactérias foram detectadas na saliva de 83.9% de adultos saudáveis (Ohara-Nemoto et al. 2008). Entretanto, outros estudos relatam uma frequência variável e menor na cavidade oral de pessoas saudáveis, tanto em adultos como em idosos (Percival et al. 1991; Jacobson et al. 1997). Da mesma forma, a prevalência de *Staphylococcus* spp. em pacientes hospitalizados apresenta grande variação. Por exemplo, alguns estudos mostraram que, espécies de *Staphylococcus* foram encontradas na cavidade oral de aproximadamente 30% dos pacientes idosos examinados (Abe et al. 2001; Sumi et al. 2002; 2006; 2007). Esses dados são diferentes dos obtidos no presente estudo, cuja prevalência de CNS na saliva foi de mais de 80% dos pacientes, e em torno de 60% nas amostras de biofilme dental. Recentemente, uma pesquisa conduzida no Brasil (Pace et al. 2008) apresentou resultados semelhantes ao do presente estudo. *Staphylococcus* spp. foram detectadas em alta frequência na saliva de pacientes dentados e edêntulos (73.7% e 75%, respectivamente), ambos submetidos à intubação orotraqueal. Ao contrário de diversos estudos (Fourrier et al. 1998; Jackson et al. 1999; Abe et al. 2001; El-Solh et al. 2004; Didilescu et al. 2005; Sumi et al. 2007), a espécie *S. aureus*, um dos mais importantes patógenos nosocomiais, não foi detectada na cavidade oral de nenhuma dos pacientes investigados no presente estudo, apesar da elevada frequência de *Staphylococcus* spp. encontrada. A ausência dessa espécie pode ter resultado da metodologia utilizada (cultura), ou do número de indivíduos e amostras

avaliados. Além disso, segundo dados estatísticos das cirurgias realizadas no hospital onde foi conduzido o presente estudo, não há ocorrência de infecções por *Staphylococcus aureus*, especialmente por MRSA, particularmente pneumonia. Talvez a ausência de infecções nosocomiais por essa espécie possa ser explicada por sua ausência na cavidade oral dos pacientes que atendem esse hospital, como demonstrado pelo presente estudo. Por outro lado, todas as espécies isoladas foram *Staphylococcus* coagulase-negativos. Espécies de CNS têm se tornado um dos principais patógenos associados a infecções nosocomiais, incluindo infecções após cirurgias cardíacas (Lang et al. 1999; Tegnell et al. 2002). A importância das infecções nosocomiais por CNS está relacionada ao contínuo crescimento de cepas resistentes a antibióticos. Essas espécies podem carrear o gene *mecA*, que é o determinante primário de resistência à oxacilina tanto em *S. aureus* como nos CNS (Ito et al. 2004; Hanssen and Ericson Sollid 2006). No presente estudo, espécies de CNS carreadores do gene *mecA* foram isoladas de 15% da saliva e 11,4% das amostras de placa dental. Entretanto, essas cepas mostraram-se ligeiramente mais prevalentes nos pacientes dentados com mais de 14 dentes. O carreamento oral desse gene pelo *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) tem sido relatado em diversos estudos (Martin and Hardy 1991; Owen 1994; Rossi et al. 1995; Rossi et al. 1996; Tawara et al. 1996). Como o gene *mecA* está inserido no *SSCmec* – que é num elemento genético móvel difundido entre espécies de estafilococos – espécies de CNS podem ser consideradas reservatórios para esse gene, que pode ser transferido para outras espécies na cavidade oral de pacientes hospitalizados. Dessa forma, o gene pode ser

disseminado para outros sítios do organismo e/ou ser transferidos para outros indivíduos, se tornando uma crítica fonte de infecção nosocomial.

Considerada como um patógeno periodontal putativo (Contreras et al. 2000; Ghayoumi et al. 2002), a *D. pneumosintes* tem sido investigada no ecossistema oral de indivíduos saudáveis e portadores de doença periodontal (Doan et al. 2000; Slots et al. 2002; Gomes et al. 2006; Ferraro et al. 2007). Entretanto, não há muitos estudos na literatura avaliando a presença desse patógeno na cavidade oral de indivíduos hospitalizados. Somente um trabalho recente reportou a presença da *D. pneumosintes* na cavidade oral e em amostras de lavados broncopulmonares em pacientes com VAP (Bahrani-Mougeot et al. 2007). No presente estudo, um achado interessante foi a baixa ocorrência dessa espécie na saliva dos pacientes edêntulos, e a alta frequência, tanto na saliva quanto nas amostras de placa dental, dos pacientes dentados. Um recente estudo realizado em nosso laboratório demonstrou que a *D. pneumosintes* foi detectada mais freqüentemente em amostras de biofilme subgingival do que saliva de pacientes com doença periodontal, corroborando os resultados do presente estudo (Ferraro et al. 2007). Esses dados indicam que a *D. pneumosintes* apresenta uma preferência em colonizar pacientes dentados, principalmente portadores de doença periodontal, do que pacientes edêntulos e/ou saudáveis. Diferente da frequência das espécies de *Acinetobacter*, que não apresentaram diferenças significativas na colonização da placa dental e saliva em ambos os grupos. Como observado em outros estudos (Fourrier et al. 1998; Didilescu et al. 2005; Sumi et al. 2007), espécies de *Acinetobacter* foram detectadas em alta frequência na placa dental (59%) e

na saliva (63,6%) dos pacientes na fase pré-operatória. Esses microrganismos são considerados um dos patógenos nosocomiais mais relevantes (Bergogne-Berezin and Towner 1996), em especial a espécie *A. baumannii* que tem sido encontrada com relativa freqüência no biofilme subgengival de indivíduos com periodontite crônica, como também saúde periodontal (Colombo et al. 2002; Souto et al. 2006). Particularmente, essa espécie tem sido associada ao insucesso no tratamento periodontal, observado em pacientes com periodontite refratária (Colombo et al. 1998), provavelmente devido sua resistência à grande maioria dos antimicrobianos (Karlowsky et al. 2003). No presente estudo, não foi possível identificar a espécie *A. baumannii*, pois não foi encontrado na literatura algum iniciador específico de PCR para essa espécie para ser detectado diretamente do biofilme. Logo, foi utilizado um iniciador para identificação do gênero *Acinetobacter*. Outro dado relevante do presente estudo foi uma forte associação positiva entre a presença de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.. Ambas as espécies são evolutivamente próximas, pois pertencem à ordem Pseudomonadales (Barbe et al. 2004). Estudos prévios relatam que essas espécies podem interagir cooperativamente através de comunicações metabólicas diretas, quando estão inseridas em comunidades mistas altamente organizadas, como o biofilme dental (Moller et al. 1998; Hansen et al. 2007). Além disso, são capazes de realizar constante intercâmbio genético, incluindo genes de resistência a multi-drogas, devido sua proximidade evolutiva (Fournier et al. 2006).

Apesar da alta prevalência de *Pseudomonas* spp., a espécie *P. aeruginosa* não foi tão prevalente, estando presente em torno de 15% do total

das amostras de placa dental e saliva, e em 19% das amostras positivas para espécies de *Pseudomonas*. A prevalência dessa espécie na cavidade oral pode variar de 14%, como observado na placa subgengival de pacientes com periodontite dos Estados Unidos (Slots et al. 1990), a 61,1% em pacientes da Romênia (Ali et al. 1996). No entanto, os resultados aqui obtidos são compatíveis com diversos outros trabalhos realizados com pacientes hospitalizados e/ou pacientes com doença periodontal (Barbosa et al. 2001; Senpuku et al. 2003; El-Solh et al. 2004; Didilescu et al. 2005; Sumi et al. 2007). Por exemplo, Colombo e colaboradores (2002) avaliaram a microbiota de pacientes de ambulatório que possuíam doença periodontal, mas que nunca tinham sido tratados. A análise das amostras de biofilme subgengival revelou uma prevalência de 20% de *P. aeruginosa*. Em outro estudo realizado no Brasil com pacientes de ambulatório, espécies de *Pseudomonas* foram detectadas em 12,5% das amostras de placa subgengival avaliadas, sendo que a espécie *P. aeruginosa* foi detectada em 36% dos isolados (Barbosa et al. 2001). Diferentes espécies de *Pseudomonas*, incluindo as espécies *P. putida* e *P. fluorescens*, também são possíveis agentes de infecções nosocomiais e podem ser detectadas na cavidade oral (Anderson et al. 1991; Fujita et al. 1998; Bogaerts et al. 2008). Recentemente, *P. fluorescens* e *P. tolaasii* foram detectadas na língua e em lavados broncopulmonares de um paciente com VAP (Bahrani-Mougeot et al. 2007) demonstrando que a cavidade oral pode ser colonizada por diferentes espécies de *Pseudomonas* causadoras de infecção pulmonar.

Estudos têm demonstrado que o tempo de internação pode exercer influência na colonização oral por patógenos respiratórios. (Scannapieco et al. 1992; Fourrier et al. 1998; Didilescu et al. 2005). Com esse intuito, uma segunda coleta de saliva e biofilme dental foi obtida na fase pós-operatória, após extubação do paciente na UTI. Notou-se que algumas bactérias apresentaram uma redução na frequência de colonização oral enquanto outras aumentaram após a cirurgia. Essa falta de um padrão único referente às alterações na frequência dos patógenos respiratórios entre as duas coletas pode ser resultado do emprego de profilaxia antibiótica pré-operatória. Todos os pacientes foram submetidos ao protocolo profilático; cefazolina 1g na indução anestésica, 1g no 30º minuto da circulação extracorpórea, e doses de 1g a cada oito horas até a 24ª h de pós-operatório. Como a cefazolina é uma cefalosporina de 1ª geração, pertencente ao grupo dos antibióticos beta-lactâmicos, seu uso pode ter reduzido determinadas espécies, bem como selecionado outras intrinsecamente resistentes. Por exemplo, houve uma pequena diminuição na frequência de detecção das espécies de *Pseudomonas* nos sítios periodontais no pós-operatório, selecionando as mais resistentes, ao mesmo tempo em que houve um aumento na prevalência de colonização pelos CNS portadores do gene de resistência *mecA*. É possível também que diferenças metodológicas, incluindo os momentos das coletas e a população estudada, tenham influenciado esses resultados. Por exemplo, dois estudos (Scannapieco et al. 1992; Fourrier et al. 1998) avaliaram amostras de placa dental somente de indivíduos internados exclusivamente em UTI's. No presente estudo, a primeira coleta foi feita na enfermaria (quarto simples) e a segunda

na UTI. Além disso, todos os pacientes foram submetidos à intervenção cirúrgica programada (eletiva), e não apresentaram qualquer doença sistêmica, ao contrário dos outros estudos cujos indivíduos avaliados apresentavam-se em condições de risco de vida. Um resultado interessante foi a diferença na frequência de detecção de *Acinetobacter* spp. entre as duas coletas. Nas amostras de saliva dos pacientes edêntulos, sua prevalência diminuiu drasticamente após a extubação, mas não sofreu mudanças significativas na saliva dos dentados. Por outro lado, analisando a frequência de colonização dos sítios periodontais, sua prevalência aumentou consideravelmente após a extubação nos pacientes que apresentavam mais de 14 dentes (de 62.3% para 91.7%). Patógenos bem estabelecidos numa comunidade polimicrobiana como o biofilme dental, podem ser mais difíceis de serem erradicados devido à maior resistência a agentes antimicrobianos e à resposta imune do hospedeiro, quando inseridos nessas estruturas de biofilmes. Com isso, pode haver uma maior probabilidade de persistência e/ou re-infecção (Smith et al. 2001).

As diferentes metodologias empregadas nos diversos estudos que avaliam a colonização oral de patógenos respiratórios pode ser um fator determinante para as diferenças encontradas na frequência de detecção bacteriana. De modo geral, os estudos que utilizaram cultura como métodos de identificação mostram uma menor frequência de detecção bacteriana na cavidade oral em comparação com o presente estudo (Slots et al. 1988; Slots et al. 1991; Scannapieco et al. 1992; Fourrier et al. 1998; Barbosa et al. 2001; Sumi et al. 2006; Sumi et al. 2007). Uma explicação plausível para essa diferença é a capacidade dos métodos moleculares em detectar DNA de

bactérias não viáveis. No entanto, é muito improvável que uma molécula de DNA de uma bactéria não viável permaneça íntegra num meio tão complexo como o biofilme dental ou saliva ao longo do tempo (Roberts and Mullany 2006). Após a morte celular, a molécula de DNA bacteriano sofre rapidamente a ação de nucleases de outros microrganismos habitantes da cavidade oral. Essas diferenças estão mais relacionadas à técnica empregada, tendo em vista que o PCR possui maior sensibilidade para detecção do que a cultura (Boutaga et al. 2005).

A grande diversidade de superfícies na cavidade oral fornece inúmeros sítios ecológicos para colonização com uma grande variedade de microrganismos, incluindo patógenos respiratórios (Mager et al. 2003). A inflamação e infecção periodontal parece favorecer o estabelecimento destas espécies pela presença de uma microbiota oral supra e subgingival complexa (Socransky et al. 1998). Entretanto, não é sabido exatamente o papel que esses microrganismos patogênicos desempenham na microbiota oral de pacientes com periodontite e saúde periodontal, assim como seu favorecimento no desenvolvimento de infecções respiratórias. Sabe-se, porém, que quando essas espécies colonizam e se estabelecem em um biofilme, como o biofilme dental, tendem a ser menos susceptíveis à ação dos antimicrobianos e ao sistema imune, resultando no surgimento de focos de infecção e re-infecção e insucesso terapêutico (Smith et al. 2001). Deste modo, estudos longitudinais futuros são necessários para se saber se a colonização destes microrganismos é transiente ou permanente. Esses trabalhos poderão orientar clínicos e pesquisadores quanto à prevenção do carreamento oral desses

microorganismos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que diminuirão o risco de disseminação, e conseqüentemente infecções nosocomiais, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Mais ainda, reforçarão a importância dos cuidados com a manutenção da saúde oral de pacientes hospitalizados. De fato, diversos pesquisadores têm sugerido protocolos de terapias de descontaminação oral, através de agentes químicos locais (clorexidina e povidone-iodine), e por meio da remoção mecânica de placa dental, a fim de reduzir a incidência de pneumonia nosocomial (DeRiso et al. 1996; Bergmans et al. 2001; Okuda et al. 2003; Fourrier et al. 2005; Mori et al. 2006; Kishimoto and Urade 2007). O uso da clorexidina como terapia profilática química é descrito em vários trabalhos, porém os resultados são conflitantes. DeRiso e colaboradores (1996) investigaram se a clorexidina como enxaguante bucal poderia ser útil na prevenção de pneumonia em pacientes submetidos à cirurgia cardíaca programada. Os resultados mostraram que houve uma redução de 65% nos casos de pneumonia. Entretanto, outros autores não demonstraram nenhuma redução na descontaminação oral, nem na diminuição de quadros de infecções hospitalares (Fourrier et al. 2005). Assim, a terapia de remoção mecânica do biofilme dental tem sido indicada como uma alternativa melhor para prevenção de infecções respiratórias hospitalares. Diversos estudos obtiveram significativa redução no número de infecções nosocomiais quando a remoção profissional de placa dental foi realizada nos pacientes hospitalizados (Yoneyama et al. 2002; Mori et al. 2006; Ishikawa et al. 2008).

Os resultados do presente estudo reforçam o conceito de que a cavidade oral pode exercer a função de reservatório de microorganismos associados a infecções nosocomiais, especificamente *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. e CNS. A presença da infecção periodontal associada ao baixo nível de higiene bucal, e a falta de um programa de prevenção oral pode ser um fator determinante para o aumento da colonização de patógenos respiratórios na cavidade oral e, conseqüentemente, um importante fator de risco para o acometimento de futuras infecções pulmonares em pacientes hospitalizados.

5. CONCLUSÃO

Os patógenos respiratórios foram detectados com frequência relativamente elevada na cavidade oral dos pacientes hospitalizados submetidos à cirurgia de revascularização do miocárdio, tanto na fase pré-operatória quanto na pós-operatória.

- As espécies bacterianas mais prevalentes na saliva e biofilme dental da população estudada foram *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *Acinetobacter* spp.
- Todas as espécies de *Staphylococcus* isoladas das amostras de biofilme dental e saliva dos pacientes analisados foram espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativo. Cerca de 15% desses isolados carregavam o gene *mecA*.
- A população estudada foi constituída, na sua maioria, por indivíduos idosos e de sexo masculino, sendo cerca de 43% destes edêntulos. Pacientes dentados (100%) apresentaram Doença Periodontal Crônica moderada.
- Não houve alterações significativas da prevalência das espécies bacterianas avaliadas entre as fases pré- e pós-operatórias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen, I. and Dewhirst, F.E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* **43**, 5721-5732.

Abe, S., Ishihara, K. and Okuda, K. (2001) Prevalence of potential respiratory pathogens in the mouths of elderly patients and effects of professional oral care. *Arch Gerontol Geriatr* **32**, 45-55.

Agueda, A., Ramon, J.M., Manau, C., Guerrero, A. and Echeverria, J.J. (2008) Periodontal disease as a risk factor for adverse pregnancy outcomes: a prospective cohort study. *J Clin Periodontol* **35**, 16-22.

Ali, R.W., Velcescu, C., Jivanescu, M.C., Lofthus, B. and Skaug, N. (1996) Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* **23**, 133-139.

Anderson, D.J., Kuhns, J.S., Vasil, M.L., Gerding, D.N. and Janoff, E.N. (1991) DNA fingerprinting by pulsed field gel electrophoresis and ribotyping to distinguish *Pseudomonas cepacia* isolates from a nosocomial outbreak. *J Clin Microbiol* **29**, 648-649.

Armitage, G.C. (1999) Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* **4**, 1-6.

Bahrani-Mougeot, F.K., Paster, B.J., Coleman, S., Barbuto, S., Brennan, M.T., Noll, J., Kennedy, T., Fox, P.C. and Lockhart, P.B. (2007) Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia. *J Clin Microbiol* **45**, 1588-1593.

Barbe, V., Vallenet, D., Fonknechten, N., Kreimeyer, A., Oztas, S., Labarre, L., Cruveiller, S., Robert, C., Duprat, S., Wincker, P., Ornston, L.N., Weissenbach, J., Marliere, P., Cohen, G.N. and Medigue, C. (2004) Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, a versatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Res* **32**, 5766-5779.

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

Bartlett, J.G., Gorbach, S.L. and Finegold, S.M. (1974) The bacteriology of aspiration pneumonia. *Am J Med* **56**, 202-207.

Berberi, E.F., Cockerill, F.R., 3rd and Steckelberg, J.M. (1997) Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. *Mayo Clin Proc* **72**, 532-542.

Bergmans, D.C., Bonten, M.J., Gaillard, C.A., Paling, J.C., van der Geest, S., van Tiel, F.H., Beysens, A.J., de Leeuw, P.W. and Stobberingh, E.E. (2001) Prevention of ventilator-associated pneumonia by oral decontamination: a prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Am J Respir Crit Care Med* **164**, 382-388.

Bergogne-Berezin, E. and Towner, K.J. (1996) *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* **9**, 148-165.

Bogaerts, P., Huang, T.D., Rodriguez-Villalobos, H., Bauraing, C., Deplano, A., Struelens, M.J. and Glupczynski, Y. (2008) Nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas putida* isolates producing VIM-2 and VIM-4 metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* **61**, 749-751.

Boutaga, K., van Winkelhoff, A.J., Vandenbroucke-Grauls, C.M. and Savelkoul, P.H. (2005) Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**, 191-199.

Bowton, D.L. (1999) Nosocomial pneumonia in the ICU--year 2000 and beyond. *Chest* **115**, 28S-33S.

Brennan, M.T., Bahrani-Mougeot, F., Fox, P.C., Kennedy, T.P., Hopkins, S., Boucher, R.C. and Lockhart, P.B. (2004) The role of oral microbial colonization

in ventilator-associated pneumonia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **98**, 665-672.

Brodala, N., Merricks, E.P., Bellinger, D.A., Damrongsri, D., Offenbacher, S., Beck, J., Madianos, P., Sotres, D., Chang, Y.L., Koch, G. and Nichols, T.C. (2005) Porphyromonas gingivalis bacteremia induces coronary and aortic atherosclerosis in normocholesterolemic and hypercholesterolemic pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**, 1446-1451.

Broussard, D.L. and Altschuler, S.M. (2000) Central integration of swallow and airway-protective reflexes. *Am J Med* **108 Suppl 4a**, 62S-67S.

Chen, A.C., Liu, C.C., Yao, W.J., Chen, C.T. and Wang, J.Y. (1995) Actinobacillus actinomycetemcomitans pneumonia with chest wall and subphrenic abscess. *Scand J Infect Dis* **27**, 289-290.

Childs, W.C., 3rd and Gibbons, R.J. (1990) Selective modulation of bacterial attachment to oral epithelial cells by enzyme activities associated with poor oral hygiene. *J Periodontal Res* **25**, 172-178.

Colombo, A.P., Haffajee, A.D., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Smith, C.M., Cugini, M.A. and Socransky, S.S. (1998) Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* **25**, 169-180.

Colombo, A.P., Teles, R.P., Torres, M.C., Souto, R., Rosalem, W.J., Mendes, M.C. and Uzeda, M. (2002) Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* **73**, 360-369.

Combes, A., Figliolini, C., Trouillet, J.L., Kassis, N., Wolff, M., Gibert, C. and Chastre, J. (2002) Incidence and outcome of polymicrobial ventilator-associated pneumonia. *Chest* **121**, 1618-1623.

Contreras, A., Doan, N., Chen, C., Rusitanonta, T., Flynn, M.J. and Slots, J. (2000) Importance of Dialister pneumosintes in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **15**, 269-272.

DeRiso, A.J., 2nd, Ladowski, J.S., Dillon, T.A., Justice, J.W. and Peterson, A.C. (1996) Chlorhexidine gluconate 0.12% oral rinse reduces the incidence of total nosocomial respiratory infection and nonprophylactic systemic antibiotic use in patients undergoing heart surgery. *Chest* **109**, 1556-1561.

Deshpande, R.G., Khan, M.B. and Genco, C.A. (1998) Invasion of aortic and heart endothelial cells by Porphyromonas gingivalis. *Infect Immun* **66**, 5337-5343.

Didilescu, A.C., Skaug, N., Marica, C. and Didilescu, C. (2005) Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases. *Clin Oral Investig* **9**, 141-147.

Doan, N., Contreras, A., Flynn, J., Slots, J. and Chen, C. (2000) Molecular identification of *Dialister pneumosintes* in subgingival plaque of humans. *J Clin Microbiol* **38**, 3043-3047.

Dodman, T., Robson, J. and Pincus, D. (2000) *Kingella kingae* infections in children. *J Paediatr Child Health* **36**, 87-90.

El-Solh, A.A., Pietrantonio, C., Bhat, A., Okada, M., Zambon, J., Aquilina, A. and Berbari, E. (2004) Colonization of dental plaques: a reservoir of respiratory pathogens for hospital-acquired pneumonia in institutionalized elders. *Chest* **126**, 1575-1582.

Eriksen, H.M., Dimitrov, V., Rohlin, M., Petersson, K. and Svensater, G. (2006) The oral ecosystem: implications for education. *Eur J Dent Educ* **10**, 192-196.

Estes, R.J. and Meduri, G.U. (1995) The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: I. Mechanisms of bacterial transcolonization and airway inoculation. *Intensive Care Med* **21**, 365-383.

Ferraro, C.T., Gornic, C., Barbosa, A.S., Peixoto, R.J. and Colombo, A.P. (2007) Detection of *Dialister pneumosintes* in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease. *Anaerobe* **13**, 244-248.

Forner, L., Larsen, T., Kilian, M. and Holmstrup, P. (2006) Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* **33**, 401-407.

Fournier, P.E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D. and Claverie, J.M. (2006) Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* **2**, e7.

Fourrier, F., Dubois, D., Pronnier, P., Herbecq, P., Leroy, O., Desmettre, T., Pottier-Cau, E., Boutigny, H., Di Pompeo, C., Durocher, A. and Roussel-Delvallez, M. (2005) Effect of gingival and dental plaque antiseptic decontamination on nosocomial infections acquired in the intensive care unit: a double-blind placebo-controlled multicenter study. *Crit Care Med* **33**, 1728-1735.

Fourrier, F., Duvivier, B., Boutigny, H., Roussel-Delvallez, M. and Chopin, C. (1998) Colonization of dental plaque: a source of nosocomial infections in intensive care unit patients. *Crit Care Med* **26**, 301-308.

Fujita, J., Negayama, K., Ohara, M., Hojo, S., Obayashi, Y., Miyawaki, H., Yamaji, Y. and Takahara, J. (1998) Pneumonia caused by *Pseudomonas putida* with a mucoid phenotype. *Respir Med* **92**, 693-695.

Gendron, R., Grenier, D. and Maheu-Robert, L. (2000) The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. *Microbes Infect* **2**, 897-906.

Ghayoumi, N., Chen, C. and Slots, J. (2002) *Dialister pneumosintes*, a new putative periodontal pathogen. *J Periodontal Res* **37**, 75-78.

Goldenberg, D.L. (1998) Septic arthritis. *Lancet* **351**, 197-202.

Gomes, S.C., Piccinin, F.B., Oppermann, R.V., Susin, C., Nonnenmacher, C.I., Mutters, R. and Marcantonio, R.A. (2006) Periodontal status in smokers and never-smokers: clinical findings and real-time polymerase chain reaction quantification of putative periodontal pathogens. *J Periodontol* **77**, 1483-1490.

Goncalves Lde, S., Ferreira, S.M., Silva, A., Jr., Villoria, G.E., Costinha, L.H., Souto, R., Uzeda, M.D. and Colombo, A.P. (2004) Association of T CD4 lymphocyte levels and subgingival microbiota of chronic periodontitis in HIV-infected Brazilians under HAART. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **97**, 196-203.

Goncalves Lde, S., Soares Ferreira, S.M., Souza, C.O., Souto, R. and Colombo, A.P. (2007) 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* **78**, 87-96.

Hansen, S.K., Haagensen, J.A., Gjermansen, M., Jorgensen, T.M., Tolker-Nielsen, T. and Molin, S. (2007) Characterization of a *Pseudomonas putida* rough variant evolved in a mixed-species biofilm with *Acinetobacter* sp. strain C6. *J Bacteriol* **189**, 4932-4943.

Hanssen, A.M. and Ericson Sollid, J.U. (2006) SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**, 8-20.

Hunter, J.D. (2006) Ventilator associated pneumonia. *Postgrad Med J* **82**, 172-178.

Ishikawa, A., Yoneyama, T., Hirota, K., Miyake, Y. and Miyatake, K. (2008) Professional oral health care reduces the number of oropharyngeal bacteria. *J Dent Res* **87**, 594-598.

Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H. and Hiramatsu, K. (2004) Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 2637-2651.

Jackson, M.S., Bagg, J., Gupta, M.N. and Sturrock, R.D. (1999) Oral carriage of staphylococci in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **38**, 572-575.

Jacobson, J.J., Patel, B., Asher, G., Woolliscroft, J.O. and Schaberg, D. (1997) Oral staphylococcus in older subjects with rheumatoid arthritis. *J Am Geriatr Soc* **45**, 590-593.

Janket, S.J., Baird, A.E., Chuang, S.K. and Jones, J.A. (2003) Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **95**, 559-569.

Jenkinson, H.F. and Lamont, R.J. (2005) Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol* **13**, 589-595.

Johanson, W.G. and Dever, L.L. (2003) Nosocomial pneumonia. *Intensive Care Med* **29**, 23-29.

Joshiyura, K. (2002) The relationship between oral conditions and ischemic stroke and peripheral vascular disease. *J Am Dent Assoc* **133 Suppl**, 23S-30S.

Kamma, J.J., Nakou, M. and Baehni, P.C. (1999) Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J Periodontal Res* **34**, 25-33.

Karlowsky, J.A., Draghi, D.C., Jones, M.E., Thornsberry, C., Friedland, I.R. and Sahm, D.F. (2003) Surveillance for antimicrobial susceptibility among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from

hospitalized patients in the United States, 1998 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1681-1688.

Kishimoto, H. and Urade, M. (2007) Mechanical tooth cleaning before chlorhexidine application. *Am J Respir Crit Care Med* **175**, 418.

Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Blehert, D.S., Eglund, P.G., Foster, J.S. and Palmer, R.J., Jr. (2002) Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 486-505, table of contents.

Korcova, J., Koprnova, J. and Krcmery, V. (2005) Bacteraemia due to *Pseudomonas putida* and other *Pseudomonas non-aeruginosa* in children. *J Infect* **51**, 81.

Lafaurie, G.I., Mayorga-Fayad, I., Torres, M.F., Castillo, D.M., Aya, M.R., Baron, A. and Hurtado, P.A. (2007) Periodontopathic microorganisms in peripheral blood after scaling and root planing. *J Clin Periodontol* **34**, 873-879.

Lang, S., Livesley, M.A., Lambert, P.A., Elliott, J. and Elliott, T.S. (1999) The genomic diversity of coagulase-negative staphylococci associated with nosocomial infections. *J Hosp Infect* **43**, 187-193.

Lee, S.C., Hua, C.C., Yu, T.J., Shieh, W.B. and See, L.C. (2005) Risk factors of mortality for nosocomial pneumonia: importance of initial anti-microbial therapy. *Int J Clin Pract* **59**, 39-45.

Li, X., Kolltveit, K.M., Tronstad, L. and Olsen, I. (2000) Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev* **13**, 547-558.

Lin, D., Smith, M.A., Champagne, C., Elter, J., Beck, J. and Offenbacher, S. (2003) Porphyromonas gingivalis infection during pregnancy increases maternal tumor necrosis factor alpha, suppresses maternal interleukin-10, and enhances fetal growth restriction and resorption in mice. *Infect Immun* **71**, 5156-5162.

Loesche, W.J. and Grossman, N.S. (2001) Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clin Microbiol Rev* **14**, 727-752, table of contents.

Luna, C.M. and Aruj, P.K. (2007) Nosocomial Acinetobacter pneumonia. *Respirology* **12**, 787-791.

Mager, D.L., Ximenez-Fyvie, L.A., Haffajee, A.D. and Socransky, S.S. (2003) Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* **30**, 644-654.

Martin, M.V. and Hardy, P. (1991) Two cases of oral infection by methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Br Dent J* **170**, 63-64.

McGaw, T. (2002) Periodontal disease and preterm delivery of low-birth-weight infants. *J Can Dent Assoc* **68**, 165-169.

Mojon, P. (2002) Oral health and respiratory infection. *J Can Dent Assoc* **68**, 340-345.

Moller, S., Sternberg, C., Andersen, J.B., Christensen, B.B., Ramos, J.L., Givskov, M. and Molin, S. (1998) In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members. *Appl Environ Microbiol* **64**, 721-732.

Mori, H., Hirasawa, H., Oda, S., Shiga, H., Matsuda, K. and Nakamura, M. (2006) Oral care reduces incidence of ventilator-associated pneumonia in ICU populations. *Intensive Care Med* **32**, 230-236.

Morris, J.F. and Sewell, D.L. (1994) Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinomyces israelii*: case report and review. *Clin Infect Dis* **18**, 450-452.

Murdoch, F.E., Sammons, R.L. and Chapple, I.L. (2004) Isolation and characterization of subgingival staphylococci from periodontitis patients and controls. *Oral Dis* **10**, 155-162.

Niemeyer, D.M., Pucci, M.J., Thanassi, J.A., Sharma, V.K. and Archer, G.L. (1996) Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* **178**, 5464-5471.

O'Reilly, P.G. and Claffey, N.M. (2000) A history of oral sepsis as a cause of disease. *Periodontol 2000* **23**, 13-18.

O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. (2000) Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**, 49-79.

Ohara-Nemoto, Y., Haraga, H., Kimura, S. and Nemoto, T.K. (2008) Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal oral trafficking of the bacteria. *J Med Microbiol* **57**, 95-99.

Okuda, M., Kaneko, Y., Ichinohe, T., Ishihara, K. and Okuda, K. (2003) Reduction of potential respiratory pathogens by oral hygienic treatment in patients undergoing endotracheal anesthesia. *J Anesth* **17**, 84-91.

Owen, M.K. (1994) Prevalence of oral methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an institutionalized veterans population. *Spec Care Dentist* **14**, 75-79.

Pace, M.A., Watanabe, E., Facetto, M.P. and Andrade, D. (2008) *Staphylococcus* spp. in the saliva of patients with orotracheal intubation. *Revista Panamericana de Infectologia* **10**, 8-12.

Padilla, C., Lobos, O., Hubert, E., Gonzalez, C., Matus, S., Pereira, M., Hasbun, S. and Descouvieres, C. (2006) Periodontal pathogens in atheromatous plaques isolated from patients with chronic periodontitis. *J Periodontal Res* **41**, 350-353.

Page, R.C. (1998) The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann Periodontol* **3**, 108-120.

Page, R.C. and Kornman, K.S. (1997) The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000* **14**, 9-11.

Page, R.C., Offenbacher, S., Schroeder, H.E., Seymour, G.J. and Kornman, K.S. (1997) Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* **14**, 216-248.

Paju, S. and Scannapieco, F.A. (2007) Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. *Oral Dis* **13**, 508-512.

Paster, B.J., Olsen, I., Aas, J.A. and Dewhirst, F.E. (2006) The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol 2000* **42**, 80-87.

Percival, R.S., Challacombe, S.J. and Marsh, P.D. (1991) Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. *J Med Microbiol* **35**, 5-11.

Pesola, G.R. (2004) Ventilator-associated pneumonia in institutionalized elders: are teeth a reservoir for respiratory pathogens? *Chest* **126**, 1401-1403.

Pierre Lepargneur, J., Dubreuil, L. and Levy, J. (2006) Isolation of *Dialister pneumosintes* isolated from a bacteremia of vaginal origin. *Anaerobe* **12**, 274-275.

Reddi, K., Wilson, M., Nair, S., Poole, S. and Henderson, B. (1996) Comparison of the pro-inflammatory cytokine-stimulating activity of the surface-associated proteins of periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res* **31**, 120-130.

Roberts, A.P. and Mullany, P. (2006) Genetic basis of horizontal gene transfer among oral bacteria. *Periodontol 2000* **42**, 36-46.

Rosebury, T. (1966) Microbiology. *J Am Dent Assoc* **72**, 1439-1447.

Ross, H. (1985) Postoperative wound infection with methicillin-resistant staphylococci in general surgical patients. *Aust N Z J Surg* **55**, 13-17.

Rossi, T., Laine, J., Eerola, E., Kotilainen, P. and Peltonen, R. (1995) Denture carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **345**, 1577.

Rossi, T., Peltonen, R., Laine, J., Eerola, E., Vuopio-Varkila, J. and Kotilainen, P. (1996) Eradication of the long-term carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in patients wearing dentures: a follow-up of 10 patients. *J Hosp Infect* **34**, 311-320.

Rousee, J.M., Bermond, D., Piemont, Y., Tournoud, C., Heller, R., Kehrl, P., Harlay, M.L., Monteil, H. and Jaulhac, B. (2002) Dialister pneumosintes associated with human brain abscesses. *J Clin Microbiol* **40**, 3871-3873.

Russell, S.L., Boylan, R.J., Kaslick, R.S., Scannapieco, F.A. and Katz, R.V. (1999) Respiratory pathogen colonization of the dental plaque of institutionalized elders. *Spec Care Dentist* **19**, 128-134.

Sbordone, L. and Bortolaia, C. (2003) Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig* **7**, 181-188.

Scannapieco, F.A. (1999) Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* **70**, 793-802.

Scannapieco, F.A., Bush, R.B. and Paju, S. (2003) Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. *Ann Periodontol* **8**, 54-69.

Scannapieco, F.A. and Mylotte, J.M. (1996) Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. *J Periodontol* **67**, 1114-1122.

Scannapieco, F.A., Papandonatos, G.D. and Dunford, R.G. (1998) Associations between oral conditions and respiratory disease in a national sample survey population. *Ann Periodontol* **3**, 251-256.

Scannapieco, F.A. and Rethman, M.P. (2003) The relationship between periodontal diseases and respiratory diseases. *Dent Today* **22**, 79-83.

Scannapieco, F.A., Stewart, E.M. and Mylotte, J.M. (1992) Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Crit Care Med* **20**, 740-745.

Scannapieco, F.A., Wang, B. and Shiau, H.J. (2001) Oral bacteria and respiratory infection: effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell proinflammatory cytokine production. *Ann Periodontol* **6**, 78-86.

Senpuku, H., Sogame, A., Inoshita, E., Tsuha, Y., Miyazaki, H. and Hanada, N. (2003) Systemic diseases in association with microbial species in oral biofilm from elderly requiring care. *Gerontology* **49**, 301-309.

Slots, J., Feik, D. and Rams, T.E. (1990) Prevalence and antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae, Pseudomonadaceae and Acinetobacter in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **5**, 149-154.

Slots, J., Rams, T.E., Feik, D., Taveras, H.D. and Gillespie, G.M. (1991) Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *J Periodontol* **62**, 543-547.

Slots, J., Rams, T.E. and Listgarten, M.A. (1988) Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* **3**, 47-52.

Slots, J., Sugar, C. and Kamma, J.J. (2002) Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol* **17**, 369-374.

Smith, A.J., Jackson, M.S. and Bagg, J. (2001) The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J Med Microbiol* **50**, 940-946.

Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* **28**, 12-55.

Socransky, S.S. and Haffajee, A.D. (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* **38**, 135-187.

Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C. and Kent, R.L., Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* **25**, 134-144.

Souto, R., Andrade, A.F.B.d., Uzeda, M. and Colombo, A.P.V. (2006) Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Brazilian Journal of Microbiology* **37**, 208-215.

Struelens, M.J. (1998) The epidemiology of antimicrobial resistance in hospital acquired infections: problems and possible solutions. *BMJ* **317**, 652-654.

Sumi, Y., Miura, H., Michiwaki, Y., Nagaosa, S. and Nagaya, M. (2007) Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Arch Gerontol Geriatr* **44**, 119-124.

Sumi, Y., Miura, H., Nagaya, M., Michiwaki, Y. and Uematsu, H. (2006) Colonisation on the tongue surface by respiratory pathogens in residents of a nursing home--a pilot study. *Gerodontology* **23**, 55-59.

Sumi, Y., Miura, H., Sunakawa, M., Michiwaki, Y. and Sakagami, N. (2002) Colonization of denture plaque by respiratory pathogens in dependent elderly. *Gerodontology* **19**, 25-29.

Takahashi, N. (2005) Microbial ecosystem in the oral cavity: Metabolic diversity in an ecological niche and its relationship with oral diseases. *International Congress Series* **1284**, 103-112.

Tawara, Y., Honma, K. and Naito, Y. (1996) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. *Bull Tokyo Dent Coll* **37**, 119-128.

Tegnell, A., Saeedi, B., Isaksson, B., Granfeldt, H. and Ohman, L. (2002) A clone of coagulase-negative staphylococci among patients with post-cardiac surgery infections. *J Hosp Infect* **52**, 37-42.

ten Cate, J.M. (2006) Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology* **94**, 1-9.

Terpenning, M., Bretz, W., Lopatin, D., Langmore, S., Dominguez, B. and Loesche, W. (1993) Bacterial colonization of saliva and plaque in the elderly. *Clin Infect Dis* **16 Suppl 4**, S314-316.

Terpenning, M.S. (2001) The relationship between infections and chronic respiratory diseases: an overview. *Ann Periodontol* **6**, 66-70.

Terpenning, M.S., Taylor, G.W., Lopatin, D.E., Kerr, C.K., Dominguez, B.L. and Loesche, W.J. (2001) Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc* **49**, 557-563.

Trouillet, J.L., Vuagnat, A., Combes, A., Kassis, N., Chastre, J. and Gibert, C. (2002) Pseudomonas aeruginosa ventilator-associated pneumonia: comparison of episodes due to piperacillin-resistant versus piperacillin-susceptible organisms. *Clin Infect Dis* **34**, 1047-1054.

Villers, D., Espaze, E., Coste-Burel, M., Giauffret, F., Ninin, E., Nicolas, F. and Richet, H. (1998) Nosocomial *Acinetobacter baumannii* infections: microbiological and clinical epidemiology. *Ann Intern Med* **129**, 182-189.

Vincent, J.L. (1999) Prevention of nosocomial bacterial pneumonia. *Thorax* **54**, 544-549.

Waters, C.M. and Bassler, B.L. (2005) Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 319-346.

Wielders, C.L., Vriens, M.R., Brisse, S., de Graaf-Miltenburg, L.A., Troelstra, A., Fler, A., Schmitz, F.J., Verhoef, J. and Fluit, A.C. (2001) Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1674-1675.

Wikstrom, M. and Linde, A. (1986) Ability of oral bacteria to degrade fibronectin. *Infect Immun* **51**, 707-711.

Wilson, M., Reddi, K. and Henderson, B. (1996) Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res* **31**, 393-407.

Withers, H., Swift, S. and Williams, P. (2001) Quorum sensing as an integral component of gene regulatory networks in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**, 186-193.

Yoneyama, T., Yoshida, M., Ohru, T., Mukaiyama, H., Okamoto, H., Hoshiba, K., Ihara, S., Yanagisawa, S., Ariumi, S., Morita, T., Mizuno, Y., Ohsawa, T., Akagawa, Y., Hashimoto, K. and Sasaki, H. (2002) Oral care reduces pneumonia in older patients in nursing homes. *J Am Geriatr Soc* **50**, 430-433.

Yuan, A., Yang, P.C., Lee, L.N., Chang, D.B., Kuo, S.H. and Luh, K.T. (1992) *Actinobacillus actinomycetemcomitans* pneumonia with chest wall involvement and rib destruction. *Chest* **101**, 1450-1452.

Zijlstra, E.E., Swart, G.R., Godfroy, F.J. and Degener, J.E. (1992) Pericarditis, pneumonia and brain abscess due to a combined *Actinomyces*--*Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Infect* **25**, 83-87.

7. ANEXOS

Anexo 1-

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo da associação da doença periodontal com a prevalência de quadros de pneumonia nosocomial após cirurgias de revascularização do miocárdio.

Informações Iniciais

O Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa neste hospital. Esta pesquisa irá estudar a doença periodontal como possível causa de pneumonia no hospital. A doença periodontal é uma doença da gengiva que varia desde um sangramento ao passar o fio dental ou ao escovar os dentes, que é chamada de gengivite, até o dente ficar mole e cair, chamada de periodontite. A doença periodontal é comum em toda população adulta brasileira e mundial. Ela está ligada a bactérias que existem na boca. Alguns cientistas já estudam a ligação da doença periodontal e a pneumonia no hospital.

Explicação sobre o procedimento e seus riscos

Esse estudo terá 3 etapas.

A primeira etapa será a anotação de dados da saúde da sua boca. Ela é chamada de exame periodontal. Nesse exame será feito uma medição entre a gengiva e o dente com um instrumento chamado de sonda, que é parecido com uma régua muito pequena. Essa sonda irá medir o espaço entre os seus dentes e a sua gengival. Também será usado um espelho pequeno para ajudar a ver e examinar todos os dentes. Essa fase terminará quando todos os seus dentes forem examinados.

A segunda fase acontecerá no dia seguinte ao exame. Essa fase é chamada de fase de coleta no pré-operatório, ou seja, antes da cirurgia. Nela será retirada porções de massa de bactérias dos seus dentes, da gengiva e da língua. Nesta etapa também será retirada sua saliva. Essas massas serão levadas a um laboratório para exame.

A última etapa será logo após sua cirurgia do coração. Ela será igual à segunda etapa. Serão retiradas porções de massa de bactérias de seus dentes, de sua gengiva e de sua língua; e também será retirada sua saliva.

Essas etapas não trarão nenhum prejuízo para sua saúde. Não é comum o senhor(a) sentir alguma dor ao ser examinado(a), mas pode sentir um pequeno desconforto. Também não é comum o sangramento da gengiva. Num estudo realizado neste hospital, foram examinados 150 pacientes e somente em um (1) paciente ocorreu sangramento. Esse paciente estava tomando remédios especiais. Se for visto que o senhor(a) possui a doença periodontal, será indicado um centro de referência para o senhor(a) tratar essa doença.

Direitos do paciente

A sua participação é inteiramente voluntária.

Durante o estudo o(a) Sr.(a) deve se sentir livre para questionar o que desejar, e caso não se considere suficientemente esclarecido pelo profissional que o(a) estiver atendendo, poderá solicitar o contato direto como investigador responsável por este estudo, o **Dr. David Zuanazzi Jr.**, ou fazê-lo diretamente no telefone 8747-5010.

Uma vez aceitando participar desta pesquisa, o(a) S.r.(a) deverá se sentir livre para abandonar o estudo a qualquer momento do curso deste, sem que isto afete o seu cuidado ou tratamento futuro neste hospital. O seu médico também poderá retirá-lo do estudo a qualquer momento, se ele julgar que seja necessário para seu bem estar.

Caso surja alguma dúvida quanto à ética do estudo o (a) Sr.(a) deverá se reportar ao Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos – subordinado ao Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde contactando diretamente o coordenador do referido comitê deste hospital, Dr. _____ no tel. _____ - _____ ramal _____. O(a) Sr.(a) tem direito ao completo sigilo de sua identidade quanto a sua participação neste estudo, incluindo a eventualidade da apresentação deste estudo em congressos médicos e jornais científicos.

Diante do exposto nos parágrafos anteriores eu, firmado abaixo, (primeiro nome e sobrenome). _____, residente à (endereço) _____

_____ concordo em participar do estudo "Associação da doença periodontal com a prevalência de quadros de pneumonia nosocomial após cirurgias de revascularização do miocárdio".

Eu fui completamente orientado pelo **Dr. David Zuanazzi Jr.**, que está realizando o estudo, de acordo com sua natureza, propósito e duração. Eu pude questioná-lo sobre todos os aspectos do estudo. Além disto, ele/ela me entregou uma cópia da folha de informações para os participantes a qual li, compreendi e me deu plena liberdade para decidir acerca da minha espontânea participação nesta pesquisa.

Depois de tal consideração, concordo em cooperar com o **Dr. David Zuanazzi Jr.** e informá-lo imediatamente sobre qualquer anormalidade observada.

Estou ciente que sou livre para sair do estudo a qualquer momento, se assim desejar.

Minha identidade jamais será publicada e os dados colhidos permanecerão confidenciais. Concordo que estes poderão ser examinados por pessoas envolvidas no estudo com autorização delegada do investigador e por pessoas representantes do Ministério da Saúde. Eu concordo que não procurarei restringir o uso que se fará sobre os resultados.

Data e assinatura procedem que este tenha sido "Lido e Aprovado".

Investigador: Data: _____

Assinatura _____

Testemunha: Data: _____

Assinatura _____

Participante: Data: _____

Assinatura: _____



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ASSISTÊNCIA A SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA LARANJEIRAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CARTA DE APROVAÇÃO

Prezados Senhores:

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto Nacional de Cardiologia Laranjeiras reuniu-se em 06 de Junho de 2006 e aprovou por unanimidade o Projeto “Relação entre microbiota oral, Doença Periodontal e Pneumonia Nosocomial”, sob responsabilidade do investigador principal Dentista David Zuanazzi Junior, sendo registrado neste CEP sob o n.º0100/05.05.2006.

Rio de Janeiro, 23 de Agosto de 2006.

A handwritten signature in blue ink, which appears to read 'Ivan Cordovil', is written over a horizontal line.

Dr. Ivan Luiz Cordovil de Oliveira
Coordenador do CEP

FICHA DE ANAMNESE

Fase <input type="checkbox"/> Pré-operatório ___/___/___ ___:___h <input type="checkbox"/> Dia da Cirurgia ___/___/___ ___:___h <input type="checkbox"/> Pós-operatório ___/___/___ ___:___h	Data Internação: ___/___/___ Prontuário: _____ Número do Paciente _____
Local de Atendimento _____ Leito : _____	

1) DADOS DO PACIENTE.

Nome _____ **Sexo** masculino feminino
Data de Nascimento ___/___/___ **Altura** _____ **Peso** _____
Cor Branco Negro Pardo
Naturalidade _____ **Nacionalidade** _____
Estado Civil solteiro casado desquitado/divorciado viúvo
Formação 1º Grau 2º Grau Superior - Completo Incompleto
Trabalha? sim não **Aposentado?** sim não
Ocupação _____
Endereço _____
Bairro _____ **Cidade** _____ **UF** ___
CEP _____ - _____ **Telefone** _____ - _____ / _____ - _____

2) QUESTIONÁRIO MÉDICO.

Possui doente **cardíaco na família?** Pai Mãe Irmão (ã)
É **hipertenso?** sim não
Possui **colesterol** alto? sim não/ **Triglicerídeos** alto? sim não
Pratica alguma **atividade física?** sim não Qual? _____
Possui **insuficiência renal?** sim não
Possui algum **problema hepático?** sim não
Está sofrendo de alguma **doença infecciosa?** sim não
Qual? _____
Está sofrendo de alguma **doença inflamatória?** sim não
Qual? _____

Está sofrendo de alguma **doença respiratória**? sim não

Qual? _____

Está fazendo uso de algum **antibiótico atualmente**? sim não

Qual? _____

Fez uso de algum **antibiótico nos últimos seis meses**? sim não

Qual? _____

É **diabético**? sim não / desde a infância? sim não

Toma insulina? sim não / desde a infância? sim não

Fuma? sim -**quantos cigarros por dia**?_____há quanto tempo?
_____anos não- Se **parou** de fumar, **quanto tempo** faz? _____anos

Mais de cinco anos (), menos de cinco anos ()

3) QUESTIONÁRIO ODONTOLÓGICO.

Está em **tratamento odontológico**? sim não

Seu dentista sabe que você tem problemas cardíacos? sim não

Sabe o que é **periodontite**? sim não, ou **piorréia**? sim não

Já **perdeu algum dente** por periodontite? sim não

Está **realizando ou realizou algum tratamento** contra a doença periodontal nos **últimos seis meses**? sim não

Possui **familiar** com periodontite? pai mãe irmão (ã)

Faz uso de **fio dental**? sim não Com que frequência? _____

Troca de escova dental com que frequência? _____

Faz uso de algum **método complementar** de higiene oral?

sim não Qual? _____

Você já **perdeu algum dente**? sim não

Perdeu-o(s) por estar(em) **mole(s)**? sim não

Número de dentes presentes: _____ dentes

4) MEDICAMENTOS EM USO

Anexo 4-

FICHA CLÍNICA PERIODONTAL

NOME: _____

DATA: _____

N PACIENTE.: _____

MN. PRONTUÁRIO: _____

VESTIBULAR														
	17	16	15	14	13	12	11	21	22	23	24	25	26	27
IPV														
PBS														
NCI														
SS														
PALATINA														
IPV														
PBS														
NCI														
SS														
VESTIBULAR														
	37	36	35	34	33	32	31	41	42	43	44	45	46	47
IPV														
PBS														
NCI														
SS														
LINGUAL														
IPV														
PBS														
NCI														
SS														

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)