



**Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas
Área de Concentração Biociências**

GRACE EMANUELLE GUERREIRO DIAS ROCATTO

**PERFIL PERIODONTAL E MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES INTERNADOS EM
UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA**

Cuiabá, 2015

GRACE EMANUELLE GUERREIRO DIAS ROCATTO

**PERFIL PERIODONTAL E MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES INTERNADOS EM
UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas Área de Concentração Biociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Nogueira Porto
Co-Orientador: Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges

Cuiabá, 2015

FICHA CATALOGRÁFICA
Catálogo na Fonte

R669a Rocatto, Grace Emanuelle Guerreiro Dias.
Perfil periodontal e microbiológico de pacientes internados em unidade de terapia intensiva / Grace Emanuelle Guerreiro Dias Rocatto – Cuiabá, 2015.
64 f.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá – UNIC, para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas – Área de Concentração Biociências.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Nogueira Porto.

1. Odontologia 2. Saúde Bucal. 3. Periodontite. I. Título.

CDU: 616.311

Normalização e Ficha Catalográfica

Valéria Oliveira dos Anjos
Bibliotecária – CRB1/1713

GRACE EMANUELLE GUERREIRO DIAS ROCATTO

**PERFIL PERIODONTAL E MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES INTERNADOS
EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Odontológicas Integradas, da Universidade de Cuiabá – UNIC como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Odontológicas Integradas – Área de Concentração Biociências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Alessandra Nogueira Porto

Co-Orientador: Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges

BANCA EXAMINADORA

Orientadora Prof^a. Dr^a. Alessandra Nogueira Porto

Membro Titular Prof^a. Dr^a. Flávia Galindo Silvestre Silva

Membro Titular Prof^a. Dr^a. Andreza Maria Fábio Aranha

Cuiabá, 18 de março de 2015.

Conceito Final: _____

Dedico este trabalho aos meus amados
Zacarias, Simoni, Gleyde Kelly e Danilo
Razão da minha existência e alegria.

AGRADECIMENTOS

Ao Eterno Pai: “Porque aos seus anjos dará ordens ao teu respeito, para que te guardem em todos os teus caminhos. Eles te sustentarão nas suas mãos para não tropeçares nalguma pedra” (Salmos 91:11-12); por inúmeras vezes Ele tornou isso realidade em minha trajetória, tornando este momento possível.

Aos meus pais, pelo exemplo, amor incondicional e carinho, por terem me ensinado entre tantas lições que “não importa aonde já chegou, mas para aonde está indo...” (William Shakespeare).

Ao meu esposo, por sua companhia sempre presente, por ser meu alicerce e trazer beleza aos meus dias.

À minha irmã pela amizade e cumplicidade, sua tenra companhia me acalentou o coração inúmeras vezes.

Ao Reitor da Universidade de Cuiabá – UNIC, Rui Fava.

Ao Pró Reitor Acadêmico da Universidade de Cuiabá – UNIC, José Cláudio Percin.

À Pró Reitora Administrativa e Diretora de unidade da Universidade de Cuiabá – UNIC, Fernando Ciriaco Dias Neto.

Ao Diretor de Pós-Graduação Stricto Sensu da Kroton, Prof. Dr. Helio Suguimoto.

À Coordenadora de Pesquisa e Pós-Graduação - Stricto Sensu da Universidade de Cuiabá – UNIC, Lucélia de Oliveira Santos.

Ao Coordenador do Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas da Universidade de Cuiabá – UNIC, Prof. Dr. Álvaro Henrique Borges.

Ao Diretor da Faculdade de Odontologia da Universidade de Cuiabá – UNIC, Fábio Luis Miranda Pedro.

À minha Orientadora Prof^a. Dr^a. Alessandra Nogueira Porto, por tornar este sonho possível, o que muitas vezes me parecia uma utopia, tornou-se realidade por sua paciência em me mostrar que a trilha do mestrado não precisa ser tão dolorosa. Com certeza a luz ao fim do túnel, quando decidi desistir por pedregulhos no caminho... Minha gratidão.

Aos Professores do curso de mestrado em Odontologia por muito contribuir com meu crescimento ao longo do caminho.

Às secretárias do Programa de Mestrado da Universidade de Cuiabá, Josieire Marques Missias e Cátia Balduino Ferreira.

À minha companheira Fernanda Zanol, um anjo que se tornou o “socorro sempre presente na tribulação”.

A todos os amigos pessoais e colegas que tornaram a caminhada menos árdua e dolorida. O carinho, sorriso, palavras e ausências; expressões de um amor profundo.

A vontade de citar nomes é imensa, mas a memória e as dimensões deste capítulo me tornariam injusta.

O temor do Senhor é o princípio do conhecimento, mas os loucos desprezam a sabedoria e o ensino.

Rei Salomão

RESUMO



RESUMO

ROCATTO, G. E. G. D. **Perfil periodontal e microbiológico de pacientes internados em unidade de terapia intensiva**. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas Integradas) - Programa de Pós Graduação em Odontologia, Universidade de Cuiabá – UNIC, Cuiabá, 2015.

Os objetivos do presente estudo foram avaliar o perfil periodontal e microbiológico dos pacientes com entubação orotraqueal internados em unidade de terapia intensiva (UTI) e caracterizar os pacientes quanto ao sexo, faixa etária, raça, motivo e tempo de internação, ocorrência de infecção nosocomial e óbito. Foram avaliados 40 pacientes, divididos: grupo dentado (n=20) e desdentado (n=20). Após 24 horas de internação na UTI, a condição clínica periodontal foi avaliada por meio do índice de placa (IP), índice gengival (IG), profundidade de sondagem (PS) e nível clínico de inserção (NIC). Todas as amostras microbiológicas foram coletadas no sexto dia de internação. No grupo dentado foram coletadas do sulco gengival e no grupo desdentado foram coletadas da mucosa jugal e língua. Foi realizada a identificação e quantificação absoluta das bactérias *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*(Aa), *Porphyromonas gingivalis*(Pg) e *Tannerella forsythia* (Tf), analisadas através da qPCR em tempo real pelo equipamento *StepOne™*(Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), utilizando pares de primers específicos por sistema de amplificação com sondas *TAQMAN®*. Dos 40 pacientes avaliados, 60% eram homens, 27,5% possuíam mais de 60 anos e 22,5% tiveram como principal motivo de internação, o acidente vascular encefálico. Em relação ao tempo de internação, 55% permaneceram por 6 dias internados e 70% dos pacientes foram a óbito. Que 40% dos pacientes com periodontite e 100% com presença de biofilme dental nos sítios avaliados. Na avaliação da microbiota foi detectada diferença estatisticamente significativa entre Aa, Pg e Tf, tanto no grupo de dentados como no grupo de desdentados ($p < 0,0001$). Conclui-se que o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* foi encontrado em alta frequência nas amostras dos pacientes desdentados, fato que sugere que o ambiente bucal mesmo na ausência dos dentes, possui um meio propício para formação do biofilme bacteriano com grande potencial patogênico.

Palavras-chave: Biofilme. Unidade de Terapia Intensiva. Periodontite.

ABSTRACT



ABSTRACT

ROCATTO, G. E. G. D. **Periodontal status and microbiological profile of patients in intensive care unit.** 2015. 64 f. Dissertation (Master's Degree in Integrated Dental Clinic) - Post-Graduate Program, University of Cuiabá – UNIC, Cuiabá, 2015.

This study aimed to evaluate the periodontal status and microbiological profile of patients with tracheal intubation admitted to the intensive care unit (ICU); as well as to characterize these patients according to gender, age, race, reason and length of hospital stay, incidence of nosocomial infection and death. A total of forty patients were assessed and divided: dentulous group (n = 20) and edentulous group (n = 20). After 24 hours in the ICU, their clinical periodontal condition was evaluated through the plaque index (PI), gingival index (GI), probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL). All microbiological samples were collected on the sixth day of ICU admission. In the dentulous group, samples were collected from the gingival sulcus, whereas in the edentulous group samples were collected from the tongue and jugal mucosa. Identification and absolute quantitation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) and *Tannerella forsythia* (Tf) were performed by real-time PCR (StepOne™, Applied Biosystems, Foster City, CA) using specific primers through an amplification system with TAQMAN® probes. Of the 40 patients, 60% were male, 27.5% were older than 60 years, and 22.5% had stroke as the main reason for admission. With regard to the length of stay, 55% of patients remained hospitalized for 6 days and 70% died. As to periodontal status, 40% of patients were presented with periodontitis and 100% had dental biofilm in the sites assessed. In the assessment of microbiota, there was a statistically significant difference between Aa, Pg and Tf, both in dentulous and edentulous groups ($p < 0.0001$). In conclusion, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was found in high frequency in samples from edentulous patients, which suggests that the oral environment even in the absence of teeth favors the formation of bacterial biofilm with great pathogenic potential.

Key-words: Biofilm oral. Intensive Care Unit. Periodontitis.

UNIVERSIDADE DE CUIABÁ



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Apresentação das cepas bacterianas	41
Tabela 2 - Descrição dos primers e sondas de DNA utilizadas para cada microrganismo do estudo	42
Tabela 3 – Caracterização da população, segundo gênero, faixa etária e raça.....	45
Tabela 4 - Frequência absoluta e relativa da doença de base dos pacientes	46
Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa em relação a diabetes mellitus, tempo de internação, pneumonia e saída dos pacientes internados na UTI.....	46
Tabela 6 - Média e desvio padrão dos microrganismos, seguido do p-valor do teste de kruskal-wallis, dos grupos dentado e desdentado	47
Tabela 7 - Média e desvio padrão da avaliação microbiológica por qPCR, seguido do p-valor do teste de Mann-Withney dos grupos dentado e desdentado	47
Tabela 8 - Avaliação da interação das variáveis ANOVA para CT, Aa, Tf e Pg	48
Tabela 9 - Avaliação entre raças e microrganismo Aa dos grupos dentado e desdentado por comparações múltiplas de Tukey	48
Tabela 10 - Média, mediana e desvio padrão para PS e NCI	49



LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
B	Branco
CT	Carga Total
Ct	<i>Cycle treshold</i>
Dp	Doença Periodontal
Ec	<i>Escherichia coli</i>
EPM	Erro Padrão da Medida
IP	Índice de Placa
ISG	Índice de Sangramento Gengival
mo	Microrganismo
MI	Mililitro
µl	Microlitro
min	Minutos
NB	Não branco
NIC	Nível de Inserção Clínica
Pg	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PS	Profundidade de Sondagem
rpm	Rotações por Minuto
seg	Segundos
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Tf	<i>Tannerella forsythia</i>
Un	Universal

LISTA DE SIGLAS



LISTA DE SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
AVE	Acidente Vascular Encefálico
°C	Grau Celsius
CA	Câncer
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
HGU	Hospital Geral Universitário
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PAV	Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
SP	São Paulo
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
UNITAU	Universidade de Taubaté
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO



SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
1.1	REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA	29
2	AVALIAÇÃO DO PERFIL PERIODONTAL E MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA	32
2.1	INTRODUÇÃO.....	34
2.2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
2.2.1	População do estudo.....	38
2.2.2	Exame clínico periodontal e microbiológico.....	38
2.2.3	Extração e quantificação do DNA	40
2.2.4	Confecção dos <i>primers</i>, detecção e quantificação microbiana (real time).....	41
2.2.5	Análise estatística	43
2.3	RESULTADOS	45
2.4	DISCUSSÃO.....	50
2.5	CONCLUSÃO	56
2.6	REFERÊNCIAS	58
3	ANEXOS.....	62



UNIVERSIDADE DE CUIABÁ



1 REVISÃO DE LITERATURA

1 REVISÃO DE LITERATURA

A cavidade bucal apresenta uma das mais diversas e complexas microbiotas do corpo humano. Cerca de 700 espécies diferentes de microrganismos (mo) foram detectadas com predomínio dos gêneros como *Streptococcus*, *Neisseria*, *Veillonella*, *Actinomyces*, *Lactobacillus* e *Candida* (AAS et al., 2005). Até surgirem os primeiros dentes, predominam os microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos, entretanto, com a erupção dos dentes, há um aumento da população de bactérias anaeróbias como *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Veillonella*, superando as espécies aeróbias (SOCRANSKY et al., 2002). Na cavidade bucal, existe especificidade de colonização, como o *Streptococcus salivarius* na língua, *Streptococcus mutans* na superfície dentária e no sulco gengival predominam os anaeróbios cocos Gram positivos e espiroquetas (SOCRANSKY et al., 1998).

As bactérias *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* estão relacionadas com a progressão da doença periodontal (ASHIMOTO et al., 1996; SOCRANSKY; SMITH; HAFFAJEE, 2002), e são consideradas verdadeiros patógenos periodontais (GENCO et al., 1996). O *Treponema denticola* está relacionado à periodontite crônica e progressão da doença periodontal, além de possuir moderada evidência científica sobre seu papel na etiologia da doença periodontal (GENCO, 1996).

Paturel et al. (2004) caracterizam o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* como um microrganismo capaz de provocar alterações marcantes no hospedeiro como resultado do mecanismo de ação das suas toxinas e pela sua capacidade de aderir e penetrar nas células desse mesmo hospedeiro, facilitando assim sua disseminação.

Indivíduos dentados tem uma relação parasito-hospedeiro muito mais complexa que indivíduos desdentados, devido às diversas superfícies dentárias para a colonização microbiana (DEWHIRST et al., 2010). Quando ocorre a perda total dos dentes, as bactérias que tem tropismo para os dentes e para o periodonto diminuem consideravelmente, voltando ao predomínio das formas aeróbias e facultativas que apresentam afinidade pelas mucosas. Portanto, nos desdentados totais, ocorre severa redução do número total de microrganismos bucais (HAFFAJEE; SOCRANSKY, 1994).

Sachdeo et al. (2008) investigaram a microbiota da cavidade bucal de pacientes desdentados. Foram avaliados 61 indivíduos desdentados totais e realizados coletas do biofilme da língua, assoalho da boca, mucosa jugal, palato e saliva. As amostras foram analisadas individualmente avaliando 41 espécies bacterianas através do checkerboard DNA-DNA. Os autores verificaram a presença de patógenos periodontais, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, sendo que acreditava-se que estes mo desapareciam após a perda dos dentes naturais. Os autores relatam que diversos estudos descrevem a respeito da microbiota de pacientes dentados, mas poucos relatam sobre a microbiota da mucosa e saliva de indivíduos desdentados totais.

Em condições normais a microbiota bucal e o hospedeiro estão em harmonia e equilíbrio, desta forma, contribuindo para a integridade fisiológica e imunológica do indivíduo (SOCRANSKY et al., 1998). Entretanto, as bactérias podem sofrer interferências relacionados a fatores externos e ao hospedeiro, fatores intrínsecos, como as interações físico-químicas entre enzimas e mo, redução de saliva, e imunoglobulinas, elevação dos níveis das enzimas proteases e neuraminidases associadas a uma precária higiene bucal, levando desde uma inflamação gengival até a progressão de uma periodontite (PAGE; KORNMAN, 1997). Os fatores externos que podem influenciar a microbiota são o tabagismo, alcoolismo, corticoterapia, permanência em ambientes hospitalares, estado nutricional e higiene bucal precária ou ausente (ALBANDAR, 2002; WEIDLICH et al., 2008).

A periodontite é uma doença infecciosa de patogênese complexa que caracteriza-se clinicamente pela destruição do periodonto de inserção, podendo evoluir até a perda do dente e tendo como fator etiológico o biofilme dental (HAFFAJEE; SOCRANKY, 1994; JERVØE-STORM et al., 2007).

O processo de formação do biofilme dental pode ser dividido em três fases: formação da película que cobre a superfície dentária, colonização inicial por bactérias juntamente com a colonização secundária e maturação do biofilme (PAGE; SHROEDER, 1976). O biofilme dental forma-se rápido e inicialmente tem localização supragengival, porém pode ser facilmente removido por meio da escovação e uso de fio dental (OFFENBACHER, 1996).

Segundo Løe, Theilade e Jensen (1965), a progressão da inflamação gengival e periodontal podem ser divididas em quatro estágios: inicial, precoce,

estabelecida e avançada. Na lesão gengival inicial, a inflamação se desenvolve à medida que o biofilme é depositado sobre o dente. Em 24 horas, alterações acentuadas são evidentes no plexo microvascular, sob o epitélio juncional, já a lesão gengival precoce ocorre aproximadamente sete dias após o acúmulo de placa. Na lesão gengival estabelecida ocorre uma intensificação do estado inflamatório à medida que a exposição ao biofilme persiste. A lesão gengival-periodontal avançada, é representada por perda do osso alveolar, dano extenso às fibras, migração apical do epitélio juncional a partir da junção cimento-esmalte, e manifestações disseminadas de danos inflamatórios e imunopatológicos aos tecidos.

A lesão inicial é provavelmente a situação fisiológica ou clinicamente normal nos seres humanos. A transformação de uma situação clinicamente sadia para um estado clinicamente inflamado (gengivite ou periodontite) deve envolver uma alteração na situação microbiana, na resposta do hospedeiro, ou em ambas. A lesão estabelecida reflete a histopatologia da forma da gengivite crônica e a descrição da lesão avançada reflete a progressão da gengivite para a periodontite (PAGE; SHROEDER, 1976).

A associação entre doença periodontal (dp) e doenças sistêmicas, tem sido estudada há muitos anos, visto que esta relação pode representar um foco de disseminação de bactérias, altamente virulentas para outros locais do organismo, mesmo aqueles distantes da cavidade bucal por via hematogênica, influenciando o desenvolvimento de algumas doenças como diabetes mellitus, doenças cardiovasculares e pulmonares (JANKET et al., 2003).

Em pacientes criticamente enfermos sob cuidados intensivos, uma vez ocorrendo uma higiene bucal inadequada, o biofilme dental torna-se um reservatório propício de mo que pode agravar o processo infeccioso nos tecidos periodontais e ainda ocasionar infecções à distância (AMARAL; CORTÊS; PIRES, 2009).

A microbiota especificamente de indivíduos hospitalizados pode alterar-se durante o uso de equipamentos respiratórios contaminados, dietas enterais, contato direto e indireto com outros pacientes (transmissão cruzada) e baixa adesão à higiene das mãos pelos profissionais de saúde (SCANNAPIECO; STEWART; MYLOTTE, 1992).

Pacientes internados em UTI, em estado crítico, apresentam elevação dos

níveis de protease, que atua removendo das superfícies dos dentes uma substância protetora denominada fibronectina; glicoproteína inibidora da aderência de bacilos Gram negativos à orofaringe (SCANNAPIECO; MYLOTTE, 1996). A perda desta substância reduz o mecanismo de defesa intermediado pelas células retículo endoteliais, facilitando a fixação dos Gram negativos, resultando na alteração da microbiota normal, inclusive com a presença de *Pseudomonas aeruginosa* nas células epiteliais faríngeas e bucais (RAGHAVENDRAN et al., 2007). Tal situação clínica, aliada ao quadro de imunodepressão presente nesses pacientes, está relacionada ao desenvolvimento de pneumonia nosocomial (AMERICAN THORACIC SOCIETY & INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2005).

A pneumonia constitui-se de uma inflamação pulmonar de caráter infeccioso, em região de ácino (região onde ocorrem as trocas gasosas) ou alveolar. Pode ser causada por uma grande variedade de mo, incluindo bactérias, micoplasmas, fungos, parasitas e vírus. É usualmente classificada em pneumonia adquirida na comunidade e pneumonia nosocomial (TOEWS, 1986).

A pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) é uma infecção nosocomial que ocorre em pacientes ventilados mecanicamente, que apresentam quadro de infecção pulmonar após 48-72 horas de entubação orotraqueal e instituição da ventilação mecânica invasiva (SCANNAPIECO et al., 2003). Pacientes entubados perdem a barreira natural entre a orofaringe e a traquéia, eliminando o reflexo de tosse e promovendo o acúmulo de secreções contaminadas acima do *cuff*, levando a pneumonia, devido a um desequilíbrio entre o mecanismo de defesa do indivíduo e o agente microbiano, devido ao tamanho do inóculo ou virulência do microrganismo (AMERICAN THORACIC SOCIETY & INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2005).

Espécies bacterianas bucais têm sido associadas à pneumonia e abscessos pulmonares, sendo elas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinomyces israelii*, *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus constellatus* (WINKELHOFF; SLOTS, 1999; RAGHAVENDRAN et al., 2007).

Os mecanismos prováveis que explicam o papel potencial de bactérias bucais na patogênese da infecção respiratória são três: aspiração de patógenos bucais (tais como *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans) para o pulmão causando processo infeccioso; a doença periodontal associada a enzimas da saliva podem modificar as superfícies das mucosas promovendo a adesão e colonização por patógenos respiratórios, as quais podem ser bronco aspirado para o pulmão; as citocinas provenientes de tecidos periodontais podem alterar o epitélio respiratório promovendo a infecção por patógenos respiratórios (SCANNAPIECO; MYLOTTE, 1996; AMERICAN THORACIC SOCIETY & INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA, 2005; RAGHAVENDRAN et al., 2007).

Pinheiro et al. (2007) avaliaram pacientes diagnosticados com pneumonia nosocomial internados em UTI e realizaram exame clínico periodontal completo. O índice de sangramento gengival nos pacientes com pneumonia foi maior do que nos pacientes sem esta patologia, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Os autores verificaram que não houve associação entre a DP e a pneumonia nosocomial, apesar dos pacientes com pneumonia apresentarem higiene oral pior e maior prevalência de periodontite.

Munro et al. (2006) pesquisaram a relação entre as condições de saúde bucal de 66 pacientes em UTI e o desenvolvimento da PAV. Os autores relataram que o índice de placa aumentou e o fluxo de saliva diminuiu conforme o tempo de internação, além disso, a coleta bacteriológica da cavidade bucal mostrou um alto crescimento bacteriano entre o 1° e 4° dia e do 4° ao 7° dia de coleta e foram detectados no biofilme dental, potenciais patógenos respiratórios, como o *S. aureus* e *P. aereginosa*.

Segundo Tan et al. (2014) doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC) são uma das causas de mortalidade na UTI, e baseado nesse fato os autores avaliaram se o biofilme dental era capaz de abrigar bactérias patogênicas que podem, eventualmente, causar infecções pulmonares. Foram coletadas amostras pareadas do biofilme subgengival e do aspirado traqueal de 53 indivíduos com DPOC. Através da análise da qPCR foi verificado no biofilme dental os patógenos *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Capnocytophaga sputigena*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* e patógenos pulmonares *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus pneumoniae*. Os autores concluíram que os resultados suportam a hipótese de que patógenos do biofilme dental podem contribuir para o agravamento da DPOC.

Fourrier et al. (2005) analisaram o perfil gengival, controle de placa e o desfecho de infecções nosocomiais de indivíduos internados em unidade de terapia intensiva. Foram avaliados 228 pacientes divididos em 2 grupos: placebo e desinfecção com clorexidina gel 0,2%, 3 vezes ao dia, após a escovação e aspiração orofaríngea. Os autores verificaram que a descontaminação por clorexidina, diminuiu significativamente a colonização orofaríngea por patógenos aeróbios em pacientes entubados, entretanto sua eficácia foi insuficiente para reduzir a incidência de infecções respiratórias por bactérias multiresistentes.

Oliveira et al. (2014) avaliaram as condições periodontais supragengivais de 36 pacientes internados em UTI, após realização de diferentes formas de deplacagem do biofilme dental associado a clorexidina 0,12%. Os autores verificaram que não houve diferença significativa na utilização da clorexidina 0,12% associada à deplacagem com escova dental ou gaze no controle do biofilme dental, desde que o procedimento seja bem executado pelo profissional.

Heo et al. (2008) avaliaram a relação entre patógenos respiratórios isolados do biofilme dental, com o fluído bronco alveolar de 30 pacientes na UTI com entubação orotraqueal. Os autores verificaram que não houve distinção das cepas das espécies isoladas da boca e do fluído bronco alveolar, portanto o biofilme dental serviu de um importante reservatório de patógenos respiratórios nos pacientes entubados.

Perkins et al. (2010) avaliaram 8 tubos orotraqueais de pacientes internados em UTI após sua extubação. Os dados da qPCR mostraram que os tubos foram colonizados em 24 horas, no entanto a variação entre os pacientes foi muito alta para encontrar uma correlação positiva, entre a carga bacteriana e o período de entubação; sendo que 70% das sequências foram associadas com os gêneros da flora bucal típica, enquanto 6% associados à flora gastrointestinal. Os gêneros mais comuns identificados foram *Streptococcus*, *Prevotella* e *Neisseria*. O tubo que permaneceu por maior tempo (23 dias) foi verificado a presença de *Pseudomonas aeruginosa*.

Oliveira et al. (2007) coletaram amostras para cultura do aspirado traqueal e do biofilme no dorso da língua e na superfície dos primeiros molares superiores de 30 pacientes. Foram encontrados: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Stenotrophomas maltophilia*, *Candida albicans*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Candida tropicalis*, *Staphylococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*,

Escherichia coli e *Streptococcus pneumoniae*. O resultado desse estudo suscita a alta probabilidade da colonização de patógenos respiratórios no biofilme dental de pacientes internados em UTI, em que 70% das bactérias pesquisadas foram encontradas somente no biofilme dental.

Técnicas clássicas de microbiologia vêm sendo substituídas, em alguns casos, pela detecção molecular (PCR, hibridização *DNA-DNA Checkerboard*, sondas de DNA, PCR em tempo real) e tem apresentado reconhecida superioridade em relação à microscopia em campo escuro e técnicas de cultura em termos de sensibilidade, especificidade e quantificação de microrganismos subgengivais (SLOTS et al., 1995; VERNER et al., 2006).

A identificação dos microrganismos bucais em amostras do biofilme dental pode ser realizada de maneira prática e rápida, através de biologia molecular. O desenvolvimento de novas técnicas, objetivando a análise de DNA, RNA e proteínas, tem permitido não apenas a aquisição de conhecimento no campo da genética microbiana, mas também a criação de bases para o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas diagnósticas. A qPCR (reação em cadeia de polimerase quantitativo) é um exemplo, e tem emergido como a mais poderosa ferramenta de amplificação de determinadas espécies bacterianas com especificidade e sensibilidade (SANZ et al., 2004). Dentre as vantagens esta técnica possui maior sensibilidade, maior precisão, reprodutibilidade e acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade no processamento e menor risco de contaminação. A qPCR mostrou-se um método altamente sensível e eficaz na detecção de periodonto patógenos mesmo quando estes estão em pequenas quantidades (ROTIMI et al., 2010).

Baseado na literatura observa-se uma extensa busca na relação da microbiota bucal associada ao desenvolvimento de doenças respiratórias em indivíduos hospitalizados, e uma lacuna a respeito do perfil periodontal e microbiológico, utilizando técnicas de PCR em tempo real, em indivíduos dentados e desdentados internados em unidade de terapia intensiva.



1.1 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

1.1 REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

AAS, J. A. et al. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 11, p. 5721-32, Nov. 2005.

ALBANDAR, J. Global risk factors indicators for periodontal diseases. **Periodontol. 2000.**, v. 29, n. 1, p. 177-206, Jul. 2002.

AMARAL, S. M.; CORTÊS, A. Q.; PIRES, F. R. Pneumonia nosocomial: importância do microambiente oral. **J. Bras. Pneumol.**, v. 35, n. 1, p. 1116-24, Nov. 2009.

AMERICAN THORACIC SOCIETY E INFECTIOUS DISEASES SOCIETY OF AMERICA. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 171 n. 4, p. 388-416, Feb. 2005.

ASHIMOTO, A. et al. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 11, n. 4, p. 266-73, Aug. 1996.

DEWHIRST, F.E. et al. The human oral microbiome. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 19, p. 5002-17, Oct. 2010.

FOURRIER, F. et al. 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.**, v. 33, n. 8, p. 1728-35, Aug. 2005.

GENCO, R. J. Current view of risk factors for periodontal diseases. **J. Periodontol.**, v. 10. suppl. 10, p. 1041-9, Oct. 1996. Supplement.

GENCO, R. J. et al. Consensus report. Periodontal diseases: pathogenesis and microbial factors. **Ann. Periodontol.**, v. 1, n. 1, p. 926-32, Nov. 1996.

HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol. 2000.**, v. 5, p. 78-111, Jun. 1994.

HEO, S. M. et al. Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, n. 47, p. 1562-70, Dec. 2008.

JANKET, S. J. et al. Meta-analysis of periodontal disease and risk of coronary heart disease and stroke. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, v. 95, n. 5, p. 559-69, May 2003.

JERVØE-STORM, P. M. et al., Comparison of curet and paper point sampling of subgingival bacteria as analyzed by real-time polymerase chain reaction. **J. Periodontol.**, v. 78, n. 5, p. 909-17, May 2007.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodont.**, v. 36, p. 177-87, May/Jun. 1965.

- MUNRO, C. L. et al. Oral health Status and Development of Ventilator-Associated Pneumonia. A descriptive Study. **Am. J. Crit. Care**, v. 15, n. 5, p. 453-60, Feb. 2006.
- OFFENBACHER, S. Periodontal diseases: pathogenesis. **Ann. Periodontol.**, v. 1, n. 1, p. 821-78, Nov. 1996.
- OLIVEIRA, L. C. et al. A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. **Rev. Bras. Ter. Int.**, v. 19, n. 4, p. 428-33, Dec. 2007.
- OLIVEIRA, M. S. et al. Evaluation of Different Methods for Removing Oral Biofilm in Patients Admitted to the Intensive Care Unit. **J. Int. Oral Health**, v. 6, n. 3, p. 61-4, Jun. 2014.
- PAGE, R. C.; SCHROEDER, H. E. Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. **Lab. Invest.**, v. 34, n. 3, p. 235-49, Mar. 1976.
- PAGE, R. C.; KORNMAN, K. S. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. **Periodontol. 2000.**, v. 14, n. 1, p. 9-11, Jun. 1997.
- PASTUREL, L. et al. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. 2, p. 98-118, Fev. 2004.
- PERKINS, S. D.; WOELTJE, K. F.; ANGENENT, L. T. Endotracheal tube biofilm inoculation of oral flora and subsequent colonization of opportunistic pathogens. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 300, n. 7, p. 503-11, May 2010.
- PINHEIRO, P. G. Perfil periodontal de indivíduos adultos traqueostomizados com pneumonia nosocomial. **R. Periodontia.**, v.17, n.03, p.67-72, Set. 2007.
- RAGHAVENDRAN, K.; MYLOTTE, J. M.; SCANNAPIECO, F. A. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. **Periodontol. 2000.**, v. 44, p. 164-77, Mar. 2007.
- ROTIMI, V.O. et al. Prevalence of periodontal bacteria in saliva of Kuwaiti children at different age groups. **J. Infect. Public. Health.**, v. 3, n. 2, p. 26-82, May 2010.
- SACHDEO, A. et al. Biofilms in the edentulous oral cavity. **J. Prosthodont.**, v. 17, n. 5, p. 348-56, Jul. 2008.
- SANZ, M. et al. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. **J. Clin. Periodontol.**, v. 31, n. 12, p. 1034-47, Dez. 2004.
- SCANNAPIECO, F. A.; STEWART, E. M.; MYLOTTE, J. M. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. **Crit. Care Med.**, v. 20, n. 6, p. 740-5, Jun. 1992.

- SCANNAPIECO, F. A.; MYLOTTE, J. M. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. **J. Periodontol.**, v. 67, suppl. 10, p. 1114-22, Oct. 1996. Supplement.
- SCANNAPIECO, F. A.; BUSH, R. B.; PAJU, S. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. **Ann Periodontol.**, v. 8, n. 1, p. 54-69, Dec. 2003.
- SLOTS, J. et al. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin. Infect. Dis.**, v. 20, suppl. 2, p. 304-7, Jun. 1995. Supplement.
- SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 2, p. 134-44, Feb. 1998.
- SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.; HAFFAJEE, A. D. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, v. 29, n. 3, p. 260-8, Mar. 2002.
- TAN, L. et al. Análise metagenômica baseado no rDNA 16S de placa bacteriana e as bactérias do pulmão dentárias em pacientes com exacerbações agudas graves de pulmonar obstrutiva crônica doença. **J. Periodontol Res.**, v. 49, n. 6, p. 760-9, Dec. 2014.
- TOEWS, G. B. Determinants of bacterial clearance from the lower respiratory tract. **Semin. Respir. Infect.**, v. 1, n. 2, p. 68-78, Jun. 1986.
- VERNER, C. et al. Carpegen real-time polymerase chain reaction vs. anaerobic culture for periodontal pathogen identification. **Oral. Microbiol. Immunol.**, v. 21, n. 6, p. 341-6, Dec. 2006.
- WEIDLICH, P. Association between periodontal diseases and systemic diseases. **Braz. Oral Res.**, v. 22, suppl. 1, p. 32-43, Aug. 2008. Supplement.
- WINKELHOFF, A. J. V.; SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. **Periodontol. 2000.**, v. 20, p. 122-35, Jun. 1999.



2 PERFIL PERIODONTAL E MICROBIOLÓGICO DE PACIENTES INTERNADOS EM UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA



ESPAÇO DE CUIA



2.1 INTRODUÇÃO

2.1 INTRODUÇÃO

A colonização bacteriana bucal inicia-se nos primeiros instantes de vida, podendo perdurar e representar risco de desenvolvimento da doença periodontal (SOCRANKY et al., 1998). Com o acúmulo do biofilme inicia-se o processo de gengivite, o qual poderá em alguns indivíduos susceptíveis evoluir para periodontite (LÖE et al., 1965).

A doença periodontal tem etiologia multifatorial, origem primária infecciosa sendo desencadeada pelo acúmulo de biofilme dental, que coloniza as regiões sulculares entre a superfície do dente e a gengiva marginal, podendo acometer os tecidos de proteção e sustentação dos dentes. Alguns fatores determinam a manifestação, gravidade e progressão desta doença, como os fatores genéticos, condições sócio econômicas e composição microbiana (NUNN, 2003; MINEKOA et al., 2008).

Apesar de mais de 700 diferentes espécies já terem sido identificadas na cavidade bucal (AAS et al.; 2005); presume-se que apenas um pequeno número apresente potencial patogênico. Dentre estas espécies, destacam-se as Gram negativas, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Tannerella forsythia* que se relacionam com a progressão da doença periodontal e são conhecidas como periodontopatogênicas (WARA-ASWAPATI et al., 2009).

Segundo Cortelli et al. (2009), o diagnóstico microbiológico dos patógenos específicos, melhora a habilidade em identificar indivíduos ou sítios em risco para desenvolvimento da doença periodontal.

O relacionamento bidirecional entre a doença periodontal e doenças sistêmicas foi atribuído pelo conceito de infecção focal, o qual é definido como a disseminação de microrganismos e seus produtos de locais cronicamente infeccionados para outros órgãos do corpo (OFFENBACHER, 1996). A partir deste raciocínio, há subsídios para acreditar que a doença periodontal pode atuar negativamente na saúde sistêmica, através da disseminação de microrganismos patogênicos, ou de seus subprodutos na corrente sanguínea, agindo com uma infecção metastática sistêmica (SCANNAPIECO, 2005). As alterações sistêmicas

mais frequentes estudadas são o controle metabólico dos diabéticos, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, doenças pulmonares e o nascimento de bebês prematuros e com baixo peso (WEIDLICH et al., 2008).

Indivíduos hospitalizados, sobretudo internados em unidade de terapia intensiva (UTI), apresentam dificuldade de higienização bucal por impossibilidade do procedimento autorealizado (paciente sedado) e a presença do tubo orotraqueal; permanecem com a boca aberta, propiciando a desidratação da mucosa e diminuição do fluxo salivar e, por conseguinte, o aumento do biofilme dental (CRAVEN; STEGER, 1995; SCANNAPIECO, 1999; PAJU; SCANNAPIECO, 2007). A cavidade bucal passa, dessa forma, a sofrer colonização contínua e consequente desequilíbrio da microbiota tornando-se progressivamente mais agressiva, comprometendo a saúde integral do indivíduo (CRAVEN; STEGER, 1995).

Os microrganismos presentes na flora bucal podem atingir o trato respiratório inferior, causando contaminação através da aspiração do conteúdo da orofaringe e levando a uma pneumonia (SCANNAPIECO; MYLOTTE, 1996; SCANNAPIECO et al., 2001; HEO et al., 2008). O biofilme dental pode se associar a infecções respiratórias, principalmente em pacientes sob ventilação mecânica por meio da higiene deficiente, resultando em uma elevada concentração de patógenos na saliva, que pode ser bronco aspirado em grande quantidade, infectando o trato respiratório de indivíduos com defesa imune já deficiente (BINKLEY et al., 2004; BERRY et al., 2007).

Por fim, o biofilme dental, em condições específicas como do paciente internado em unidade de terapia intensiva, pode abrigar colônias de patógenos pulmonares promovendo ambiente propício para seu crescimento e desenvolvimento, propiciando a colonização das vias aéreas inferiores, bem como bactérias inicialmente da cavidade bucal e colonizar as vias aéreas inferiores (SCANNAPIECO, 1999; PAJU; SCANNAPIECO, 2007).

As doenças respiratórias são responsáveis por uma significativa parcela de morbidade e mortalidade em pacientes de todas as idades (SCANNAPIECO, 1999). Estas doenças são de particular interesse dos hospitais, especialmente em pacientes entubados, pois mais de 5% de todos os pacientes internados desenvolvem infecções, sendo que, a pneumonia está entre 10% e 20% dessas infecções, tornando-se a causa mais comum da infecção hospitalar (TEIXEIRA et al., 2004; PAJU;

SCANNAPIECO, 2007).

A identificação desses microrganismos bucais, tanto em amostras do trato respiratório inferior como em biofilme bacteriano dental pode ser realizada de maneira prática e rápida, através da biologia molecular. Evidências de que infecções periodontais contribuem para o desenvolvimento de pneumonia nosocomial são conflitantes, com resultados bastante diversos (HEO et al., 2008; LAZAREVIC et al., 2014).

Por outro lado, poucos estudos têm investigado a presença de microrganismos, como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*, conhecidos como periodontopatógenos com grande poder patogênico, em indivíduos dentados e desdentados.

A avaliação detalhada da condição periodontal, através do exame clínico periodontal é de grande importância para estabelecer relações entre esses valores e a avaliação da frequência dos microrganismos do biofilme coletado.

Portanto, este estudo tem o propósito de avaliar o perfil periodontal e microbiológico de indivíduos internados em unidade de terapia intensiva, bem como caracterizar os pacientes quanto ao sexo, faixa etária, raça, motivo e período da internação, ocorrência de infecção nosocomial e óbito.



2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 População do estudo

Os pacientes incluídos para este estudo foram avaliados de janeiro a dezembro de 2013, provenientes do Hospital Geral Universitário de Cuiabá – Mato Grosso, Brasil, com idade entre 18-70 anos.

Todos os pacientes admitidos na UTI foram elegíveis para o estudo baseado nos seguintes critérios: pacientes com idade superior ou igual a 18 anos, condições médicas que sugerissem a permanência na UTI por no mínimo 6 dias e pacientes com necessidade de entubação orotraqueal. Pacientes com limitação de abertura bucal ou fazendo uso de qualquer tipo de contenção, imunossuprimidos (HIV ou transplantados), menores de 18 anos de idade e com impossibilidade de coleta de dados clínicos ou microbianos foram excluídos do estudo.

Foram avaliados 78 pacientes sendo que após análise dos critérios de inclusão, principalmente devido a óbito e alta dos pacientes antes do período de 6 dias, a amostra do presente trabalho foi de 40 indivíduos, sendo 24 do sexo masculino e 16 feminino, divididos em dois grupos: grupo dentado (n=20) e desdentado (n=20).

Dados demográficos adicionais e histórico médico foram avaliados nos prontuários dos pacientes. Os pacientes ou seus responsáveis legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A) e o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade de Taubaté - UNITAU (número 444/2012) (Anexo B).

2.2.2 Exame clínico periodontal e microbiológico

O exame clínico periodontal foi realizado 24 horas após a permanência do paciente na UTI. Cada parâmetro clínico foi obtido por um único examinador cego e previamente calibrado conforme metodologia descrita por Araujo et al. (2003). Para as variáveis contínuas (profundidade de sondagem) foi utilizado o EPM (erro padrão

da medida) e para as variáveis categóricas (índices de placa e gengival) foi utilizado o teste Kappa. Assim 10 exames foram repetidos num intervalo de 30 dias e submetidos à análise. A examinadora foi considerada calibrada mediante $EPM \leq 0,8$ e $K > 0,8$ e $< 0,95$.

As mensurações clínicas analisadas foram: índice de placa visível (IP) e índice de sangramento gengival (ISG) por meio de avaliações dicotômicas (AINAMO; BAY, 1975), profundidade de sondagem (PS) que consiste na medida da distância em mm entre a margem gengival e o fundo do sulco/bolsa periodontal e nível de inserção clínica (NIC) distância em mm entre a junção cimento esmalte e o fundo do sulco/bolsa periodontal.

Os critérios para definição do diagnóstico periodontal foram: saúde periodontal determinada pela ocorrência de sangramento em menos de 25% dos sítios avaliados e com a ausência de perda de inserção clínica ≥ 3 mm. Para o diagnóstico da gengivite deveriam apresentar sangramento em valores $\geq 25\%$ dos sítios e com ausência de perda de inserção ≥ 3 mm. A periodontite, adotou-se como parâmetro a presença de quatro ou mais dentes com um ou mais sítios apresentando profundidade de sondagem ≥ 4 mm e perda de inserção clínica ≥ 3 mm no mesmo sítio, de acordo com o critério de Lopez (2002).

Medições periodontais foram realizadas em seis sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mesio-lingual, lingual, disto-lingual) para todos os dentes presentes, excetuando-se os terceiros molares, com auxílio de uma sonda periodontal manual (*PCPUNC 15, Hu-friedy, Mfg Co Inc., Chicago, IL*).

Todas as coletas microbiológicas foram realizadas no sexto dia de internação na UTI, em ambos os grupos. Nos pacientes do grupo dentado, foram coletadas amostras microbianas intra sulculares dos sítios mesio-vestibulares dos dentes 16, 11, 26, 41 e 36, sendo utilizado o cone de papel nº 30 autoclavado (*Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Suíça*). Na ausência destes elementos, foram obtidas amostras dos dentes adjacentes.

Para a coleta, cada dente foi isolado com roletes de algodão esterilizados e o biofilme dental supragengival removido com rolete de algodão esterilizado. O cone de papel foi inserido na porção mais apical do sulco periodontal e mantido em posição por 60 segundos (CORTELLI et al., 2005).

Em seguida, os cones de papel de cada indivíduo foram colocados em um único microtubo tipo *Eppendorf* (Bio-Rad®, Hercules, CA, Estados Unidos) contendo 1,0 mL de solução de *Ringer* mantidas a temperatura de -20°C até seu processamento.

Nos pacientes do grupo desdentado, a coleta da amostra microbiana foi realizada na língua e bochecha, através de coletores para língua (Alça, São Paulo, Brasil) e *swab* usado para coleta do biofilme da mucosa jugal, friccionando em mucosa jugal e rebordo alveolar (Absorve, Jiangsu Suyun Medical Materials CO Ltda, Jiangsu, China), sendo armazenado e processado da mesma maneira do grupo dentado.

2.2.3 Extração e quantificação do DNA

Para a avaliação microbiológica, a extração do DNA genômico foi realizada com auxílio do kit *PureLink™ Genomic DNA Purification Kit* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. O material foi previamente homogeneizado em agitador mecânico por 60 segundos e 500 μL da amostra foram centrifugados (3 min x 12.000 rpm). Após remoção do sobrenadante, 180 μL de *PureLink™ Genomic Digestion Buffer* e 20 μL de *Proteinase K* foram adicionados aos tubos contendo a suspensão de células bacterianas (pellet) e cada minitubo foi incubado à 55°C por 90 min. Após estes procedimentos, 20 μL de *RNase A* foi adicionado ao lisado, esta solução foi agitada e incubada por 2 min à temperatura ambiente. Em seguida, 200 μL de *PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer* e 200 μL de etanol (100%) foram adicionados e o minitubo agitado por 5 seg até a formação de uma solução homogênea. Ao término deste processo, todo o lisado (aproximadamente 640 μL) foi transferido para um coluna (contendo membrana de sílica -“*PureLink™ Spin Column*”) acoplado a um tubo de coleção, e este conjunto centrifugado à 12.000 rpm por 1 min. Em seguida, foram realizadas duas lavagens da membrana com 500 μL de *Wash Buffer 1* (12.000 rpm por 1 min) e *Wash Buffer 2* (12.000 rpm por 3 min). Finalmente, 100 μL de *PureLink™ Genomic Elution Buffer* foi utilizado na eluição do DNA fixado na membrana de sílica.

As cepas bacterianas foram provenientes da Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Tabela 1) e foram cultivadas

no laboratório de microbiologia da Universidade de Cuiabá.

Tabela 1 – Apresentação das cepas bacterianas

Bactéria	Cepa
<i>Porphyromonas gingivalis</i> (Pg)	ATCC 33277
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (Aa)	ATCC 29522
<i>Tannerella forsythia</i> (Tf)	ATCC 43037

2.2.4 Confeção dos *primers*, detecção e quantificação microbiana (real time qPCR)

Os *primers* empregados foram desenhados de acordo com a sequência específica altamente conservada do gene 16S do DNA ribossomal bacteriano de cada microrganismo envolvido e sintetizados pela Life Technologies do Brasil Ltda., São Paulo-SP (*Invitrogen Tech-LineSM*) (Tabela 2). A busca das sequências alvo desejadas foi realizada por consulta ao *NCBI Nucleotide Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O *software Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>) foi utilizado para a confecção dos *primers*. A identificação e quantificação absoluta das bactérias de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia* nas amostras clínicas foram realizadas através da PCR em tempo real pelo equipamento *StepOneTM* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*), utilizando pares de *primers* específicos por sistema de amplificação com sondas *TAQMAN[®]* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*). Em seguida, os mesmos foram testados, em relação à especificidade, empregando o programa *NCBI BLAST* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A concentração dos *primers*, bem como, as condições ideais para o processo de amplificação (concentrações dos reagentes/determinação das temperaturas envolvidas) foi previamente estabelecida para cada conjunto de *primers Forward* e *Reverse* incluídos no estudo.

A PCR em tempo real foi realizada utilizando uma solução de volume final 25 µL contendo 0,5 µL de concentração de cada primer, 0,5 µL de (200nmol) de sonda *Taqman*, 12,5 µL de *Taqman Universal PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA*) 9 µL de água estéril e 2 µL de solução de DNA. A reação de amplificação foi realizada com as seguintes etapas: temperatura de desnaturação inicial de 95°C por 10 min e amplificação por 40 ciclos a 95°C por 15 seg e 60°C por

1 min. Após a reação da qPCR foi feita a curva de dissociação (*curva de melting*) com temperatura entre 60°C e 95°C para determinar a especificidade da reação da qPCR.

Todas as reações foram realizadas em placas *MicroAmp optical 48-well* e adesivos ópticos (*Applied biosystems, Foster City, Ca, EUA*). Os dados foram analisados utilizando o programa *Step One™* (*Applied biosystems, Foster City, Ca, EUA*).

Tabela 2 - Descrição dos primers e sondas de DNA utilizadas para cada microrganismo do estudo

Primer	Sequência (3'- 5')	Referência
Pg - TAMRA-VIC		
Reverse	CAACCATGCAGCACCTACATAGAA	Saito et al. (2011)
Foward	ACCTTACCCGGGATTGAAATG	
Sonda	ATGACTGATGGTGAACCGTCTTCCCTTC	
Aa – TAMRA-FAN		
Reverse	TTCATTACGCGGCATGGC	Nonnenmacher et al. (2005)
Foward	CAAGTGTGATTAGGTAGTTGGTGGG	
Sonda	ATCGCTAGCTGGTCTGAGAGGATGGCC	
Tf - TAMRA-FAN		
Reverse	TTCGCCGGGTTATCCCTC	Yuen et al. (2009)
Foward	AGCGATGGTAGCAATACCTGTC	
Sonda	CACGGGTGAGTAACG	

Pg - *Porphyromonas gingivalis*.; Aa - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; Tf - *Tannerella forsythia*

Inicialmente, para a realização da curva padrão, foi utilizado o DNA extraído a partir da bactéria pura, onde foi realizada a leitura em espectrofotômetro (*NanoDrop® ND-1000 UV-vis, NanoDrop Technologies, Wilmington, EUA*) por meio da avaliação das absorbâncias a 260nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280nm. Obteve-se uma concentração inicial entre 0,5- 0,6 ug/ µL de cada DNA bacteriano, em seguida realizou-se 8 diluições seriadas (10^1 - 10^8) para confecção da curva padrão.

A curva padrão (a qual possuía concentração conhecida) foi utilizada para converter os score de *Ct* (*Cycle threshold*) obtidos com as amostras de fluido em números exatos de concentração de DNA.

Uma vez determinados os limites de quantificação, as amostras clínicas foram processadas juntamente com a curva padrão (controle positivo) respectivas de cada espécie bacteriana, em triplicatas, e os valores médios foram utilizados para o cálculo dos níveis bacterianos. As reações foram realizadas respeitando-se uma eficiência de amplificação para a curva padrão entre 110% a 93% (slope =-3,10 a -3,50) e um coeficiente de correlação (R^2) ≥ 0,98%. Para o ensaio da PCR em tempo real ter alta eficiência, a inclinação da curva padrão (slope) deve ser próxima de -3,30

(LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

O controle negativo foi realizado substituindo o DNA pela mesma quantidade de água estéril, a fim de checar possíveis contaminações.

2.2.5 Análise estatística

Para a análise dos objetivos clínico e microbiológico do presente estudo, foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e a análise de variância (ANOVA). Todos os testes de hipóteses desenvolvidos nesse trabalho consideraram uma significância estatística de 95% ($p < 0,05$).



2.3 RESULTADOS

2.3 RESULTADOS

Dados clínicos e amostras do biofilme dental subgingival, de língua e bochecha foram coletados de um total de 40 indivíduos internados em UTI com entubação orotraqueal, sendo 20 indivíduos dentados e 20 desdentados. Observou-se que 60% dos pacientes eram do sexo masculino, 27,5% tinham mais de 60 anos e 52,5% eram não brancos (Tabela 3).

Tabela 3 – Caracterização da população, segundo sexo, faixa etária e raça

Grupo	N	%
Dentado	20	50
Desdentado	20	50
Sexo		
Feminino	16	40
Masculino	24	60
Faixa etária		
Até 30 anos	9	22,5
30 a 40 anos	4	10
40 a 50 anos	6	15
50 a 60 anos	10	25
Mais que 60 anos	11	27,5
Raça (auto referida)		
Branco	19	47,5
Não branco	21	52,5
Total	40	100

O histórico médico relativo ao motivo da internação dos pacientes na UTI estão expressos na Tabela 4. Observou-se que a doença mais frequente foi o acidente vascular encefálico (AVC) 22,5%, seguido de câncer 15% e 12,5% com histórico de trauma crânio-encefálico.

Tabela 4 - Frequência absoluta e relativa da doença de base dos pacientes

Doença	N	%
Acidente vascular encefálico	9	22,5
Aneurisma	2	5
Câncer	6	15
Doença pulmonar obstrutiva crônica	2	5
Hipertensão Arterial	1	2,5
Insuficiência hepática	1	2,5
Insuficiência cardíaca congestiva	1	2,5
Infarto	2	5
Pneumonia	1	2,5
Trauma crânio-encefálico	5	12,5
Perfuração por arma de fogo	2	5
Choque anafilático	1	2,5
Cirrose	1	2,5
Convulsão	1	2,5
Diabetes	2	5
Overdose	1	2,5
Sepse	2	5

Em relação aos indivíduos com diabetes mellitus, 60% não apresentavam esta patologia, sendo que 40% (16) indivíduos afetados por esse distúrbio metabólico, 10 (62,5%) eram do grupo dentado. O tempo de internação de 22 indivíduos (55%) foi de 06 dias na UTI e 67,5% não desenvolveram pneumonia nosocomial. Dos 40 pacientes avaliados, 28 (70%) foram a óbito (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência absoluta e relativa em relação a diabetes mellitus, tempo de internação, pneumonia e saída dos pacientes internados na UTI

	N	%
Portadores de Diabetes		
Não	24	60
Sim	16	40
Tempo de internação		
6 dias	22	55
7 dias	8	20
8 dias	4	10
9	1	2,5
10	2	5
11	3	7,5
Pneumonia nosocomial		
Não	27	67,5
Sim	13	32,5
Saída		
Alta	12	30
Óbito	28	70

Os dados microbiológicos se referem à quantificação da carga total

bacteriana (CT), e dos patógenos periodontais *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg) e *Tannerella forsythia* (Tf). Foi detectada diferença estatisticamente significativa entre Aa, Pg, Tf e CT tanto no grupo de dentados, quanto no grupo de desdentados ($p < 0,0001$). Podemos observar na Tabela 6, os valores de Aa, Pg, Tf e principalmente CT, são de fato muito diferentes em ambos os grupos.

Tabela 6 - Média e desvio padrão dos microrganismos, seguido do p-valor do teste de kruskal-wallis, dos grupos dentado e desdentado

Grupo	Tipo	Média	Desvio Padrão	p-valor (Kruskal-Wallis)
Dentado	Aa	13836,3	34235,4	<0.0001
	Pg	35,9	99,1	
	Tf	870,5	936,2	
	CT	27706871,5	58954713,5	
Desdentado	Aa	100225,83	220709,13	<0.0001
	Pg	2,17	6,42	
	Tf	224,19	181,23	
	CT	132787151,6	225241736,2	

Na análise microbiológica através da qPCR foi constatada uma diferença estatisticamente significativa pra Tf ($p=0,041$) e Pg ($p=0,021$), sendo que a média de Tf foi de 870 para o grupo de dentado e 224 para o grupo de desdentado, e para Pg a média foi de 36 para o grupo de dentado, contra 02 para o grupo de desdentado (Tabela 7).

Tabela 7 - Média e desvio padrão da avaliação microbiológica por qPCR, seguido do p-valor do teste de Mann-Withney dos grupos dentado e desdentado

Grupo	CT		Aa		Tf		Pg	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Dentado	27706872	58954714	13836	34235	870	936	36	99
Desdentado	132787152	225241736	100226	220709	224	181	2	6
Estatística (Mann-Withney)	297		328		398		393	
p-valor (Mann-Withney)	0.261		0.885		0.041		0.021	

Foi detectado um efeito estatisticamente significativo da espécie Tf (p -

valor=0,005), sendo que para o gênero masculino a média de Tf foi de 785, contra 173 para o feminino (Tabela 8).

Também foi detectado diferença estatisticamente significativa do grupo (dentado e desdentado) em Pg ($p=0,043$), sendo que a média da espécie Pg para o grupo de dentados, apresentou-se maior comparado ao grupo de desdentados (36 e 02).

Tabela 8 - Avaliação da interação das variáveis ANOVA para CT, Aa, Tf e Pg

Grupos	CT		Aa		Tf		Pg	
	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor	F	p-valor
Grupo	2.830	0.115	0.950	0.401	0.830	0.384	4.950	0.043
Faixa etária	0.480	0.751	0.760	0.615	0.910	0.496	0.220	0.923
Sexo	1.230	0.287	4.850	0.045	13.070	0.005	0.390	0.544
Raça	0.010	0.936	0.410	0.566	0.120	0.733	1.470	0.245
Tempo de internação	0.620	0.443	0.230	0.668	1.060	0.327	0.060	0.804
Pneumonia	2.790	0.117	1.540	0.303	5.660	0.039	1.240	0.284
Saída	0.090	0.769	0.170	0.704	1.230	0.293	0.420	0.527
Grupo*Faixa etária	2.050	0.142	1.410	0.406	1.620	0.245	0.680	0.619
Grupo*Sexo	3.600	0.079	0.350	0.598	4.410	0.062	0.020	0.903
Grupo*Raça	0.330	0.577	6.480	0.023	0.070	0.798	0.520	0.483
Grupo*Tempo de internação	0.160	0.698	0.120	0.747	0.620	0.449	0.080	0.776
Grupo*Pneumonia	1.000	0.333	0.050	0.839	0.060	0.818	1.910	0.189
Grupo*Saída	0.740	0.404	0.290	0.629	0.020	0.891	1.810	0.200
p-valor (ANOVA)	0.161		0.553		0.038		0.790	
p-valor (Shapiro-Wilk)	0.045		0.141		0.985		0.075	

Já para o Aa, foi detectado um efeito estatisticamente significativo do sexo ($p=0,045$) e da interação entre grupo e raça ($p=0,023$) (Tabela 9). Sendo que a média de Aa para o sexo masculino foi maior que para o feminino. Pelas comparações múltiplas de Tukey, é possível observar que a diferença detectada na interação entre raça e grupo para Aa se dá dentro do grupo de dentados, onde os brancos apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação aos não brancos ($p=0,05$).

Tabela 9 - Avaliação entre raças e microrganismo Aa dos grupos dentado e desdentado por comparações múltiplas de Tukey

Grupo	Raça	Média	Desvio Padrão
Dentado	B	51838	100701
	NB	694	1232
Desdentado	B	3509	7093
	NB	4102	7139

Com relação à análise periodontal, 40% dos pacientes foram

diagnosticados com periodontite e com média de profundidade de sondagem de 2,83mm e nível clínico de inserção de 2,67mm. O índice de placa foi positivo em todos os sítios avaliados, demonstrando uma má higienização bucal destes pacientes. Em relação ao índice de sangramento, foi verificado em 70% dos sítios analisados, demonstrando que o processo inflamatório já se encontrava instalado no periodonto (Tabela 10).

Tabela 10 - Média, mediana e desvio padrão para PS e NCI

Variável	Média	Mediana	Desvio Padrão
PS	2,83	3,00	0,92
NCI	2,67	2,00	1,14



2.4 DISCUSSÃO

2.4 DISCUSSÃO

No presente estudo, o perfil periodontal foi avaliado nas primeiras 24 horas da admissão do paciente na UTI, com a intenção de verificar a condição gengival pré-internação. Os resultados demonstraram que os pacientes apresentaram condições periodontais desfavoráveis, incluindo altos níveis de biofilme dental (100%) e sangramento gengival (70%). Esses resultados estão de acordo com o estudo de Jones, Munro e Grap (2011), que descreveram o padrão de acúmulo de biofilme dental em adultos sob ventilação mecânica de 137 pacientes, 24 horas após a intubação orotraqueal por um período de 7 dias, evidenciando que esses indivíduos davam entrada na UTI com alterações periodontais. Esses problemas pré existentes podem aumentar a vulnerabilidade a doenças sistêmicas e complicar a gestão de higiene bucal do paciente entubado.

Indivíduos internados em UTI em estado crítico, apresentam dificuldade de higienização bucal devido à presença do tubo orotraqueal e impossibilidade do procedimento auto realizado. Esses pacientes ainda permanecem com a boca aberta, propiciando a desidratação da mucosa e diminuição do fluxo salivar levando a um aumento do biofilme dental. Desta forma, a cavidade bucal passa a sofrer colonização contínua, levando ao desequilíbrio da microbiota que se torna cada vez mais agressiva, comprometendo a saúde integral do indivíduo (CRAVEN E STEGER, 1995).

Na UTI, onde o presente estudo foi realizado, existe um protocolo de higienização oral executado uma vez ao dia, sendo realizado um esfregaço com gaze e solução antisséptica nos dentes dos pacientes, essa intervenção é realizada pelo técnico de enfermagem. Porém não houve acompanhamento deste procedimento por parte deste estudo.

Embora a microbiota bucal seja muito vasta, estudos relacionam algumas espécies bacterianas de interesse como indicadores do perfil microbiológico, analisando a doença periodontal e sua evolução, optamos pela inclusão de três espécies bacterianas *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Tannerella forsythia*. O *A. actinomycetemcomitans* é considerado um importante patógeno na etiologia da periodontite crônica (MENG, 2009), enquanto *T.*

forsythia e *P. gingivalis* são bactérias que compõem o "complexo vermelho", altamente associado com a destruição dos tecidos periodontais (RIEP, 2009).

A coleta microbiológica do presente estudo foi realizada no 6º dia após a internação na UTI. Segundo Løe et al. (1965), o 5º ou 6º dia após a retirada de todas as medidas de higiene oral, ocorre a segunda fase de proliferação bacteriana do biofilme dental, quando a proliferação de microrganismos torna-se mais intensa. Os autores destacam que os cuidados orais inadequados estão intimamente relacionados com o aumento do biofilme dental e proliferação bacteriana. No presente estudo observou-se uma grande perda da amostra inicial, principalmente por óbito e alta da UTI antes do período de 6 dias; um período maior para coleta microbiológica seria um obstáculo para execução deste estudo, diminuindo ainda mais o número da amostra principalmente pela alta taxa de óbito (70%).

A Unidade de Terapia Intensiva do HGU é referência em neurologia no município de Cuiabá, admitindo pacientes de grande gravidade e com alto risco de mortalidade o que pode explicar a elevada taxa de óbito neste estudo. Os agravos neurológicos que levaram a internação na UTI foram principalmente por acidente vascular encefálico, seguido de câncer e trauma crânio-encefálico.

Foi possível verificar uma diminuição considerável das espécies bacterianas do grupo dentados para desdentados, com diferença estatística para Pg e Tf. Estes dados concordam com estudos anteriores de Kishi et al. (2010) que avaliaram a microbiota de 165 idosos japoneses residentes na comunidade (93 dentados e 72 desdentados) por meio da PCR para 41 espécies bacterianas, e encontraram bactérias periodonto patogênicas mais frequentemente em idosos dentados do que desdentados. Entre as quatro espécies avaliadas a *Tannerella forsythia* foi mais frequentemente detectada, seguido de *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Prevotella intermedia*. Eles sugeriram ainda a existência de uma circulação estável de periodonto patógenos entre o sulco gengival e a superfície da língua ao longo do tempo, na presença de dentes.

A maior prevalência de Pg em pacientes dentados também foi encontrada no trabalho de Faghri et al. (2007) que estudaram a prevalência de Pg em 61 pacientes com periodontite crônica sem disfunções sistêmicas, com prevalência de 40% em dentados e Wara-aswapati et al. (2009) com prevalência de 45%, ao analisar amostras sulculares de adultos periodontalmente saudáveis. Estes valores confirmam a

afirmação de Lammel et al. (2000) que consideraram Pg o principal patógeno da periodontite em adultos, que corresponde ao perfil periodontal dos pacientes internados em UTI, considerando que 40% dos pacientes apresentaram periodontite.

Os resultados do presente estudo demonstram que indivíduos desdentados criticamente enfermos e submetidos à entubação orotraqueal apresentaram grande prevalência de Aa.

A perda dos dentes, sinônimo de perda do sulco gengival, pode afetar a microbiota bucal, resultando num decréscimo significativo de periodonto patógeno em indivíduos saudáveis (DANSER et al., 1994). Porém, os resultados do presente estudo demonstraram que indivíduos desdentados criticamente enfermos e submetidos à entubação orotraqueal apresentaram maior prevalência de Aa, quando comparado ao grupo dentado. Tal achado está de acordo com os estudos de Fernandes et al. (2010) que avaliaram a presença de patógenos periodontais em indivíduos idosos dentados e desdentados com histórico prévio de periodontite. Os resultados demonstraram que o Aa apresentou incidência semelhante para ambos os grupos, enquanto que os demais periodonto patógenos foram mais prevalentes especificamente no grupo dentado.

A análise dos microrganismos foi realizada por meio de uma ferramenta molecular. A reação em cadeia de polimerase quantitativo (qPCR) foi escolhida por apresentar maior sensibilidade e precisão além de reprodutibilidade, acurácia, velocidade na análise, melhor controle de qualidade no processamento e menor risco de contaminação (ROTIMI et al., 2010).

A presença de periodonto patógenos em indivíduos desdentados estão em conformidade com estudos realizados por Devides e Franco (2006) em pacientes edêntulos saudáveis também utilizando a técnica de PCR e Sachdeo et al. (2008); ambos encontraram Aa e Pg em amostras de tecido supragengivais e swab dos indivíduos desdentados. Com o atributo da ferramenta molecular, onde é possível detectar a presença de apenas um microrganismo não viável, pode-se comprovar a existência de tais patógenos, portanto as bactérias permanecem em nichos bucais após a eliminação dos dentes ainda que em baixas proporções (VAN ASSHE, 2009).

Estudos epidemiológicos em indivíduos sistemicamente sadios demonstram uma maior prevalência de doença periodontal em homens, evidenciando

maior deficiência de cuidados orais nesta população (PAPAPANOU et al., 1988; DIAMANTI-KIPIOTI et al., 1995; BROWN et al., 1996). Neste estudo a quantidade dos patógenos periodontais Tf e Aa em indivíduos do sexo masculino foram significativamente maiores do que no sexo feminino, demonstrando que indivíduos internados em UTI seguem o mesmo padrão que indivíduos saudáveis, em relação a maior prevalência no sexo masculino.

Nosso estudo demonstrou que 32,5% dos pacientes desenvolveram pneumonia nosocomial, semelhante ao estudo de Morrow et al. (2010) do qual cerca de 30% dos pacientes ventilados mecanicamente foram diagnosticados com pneumonia nosocomial associada a ventilação (PAV). Segundo Heo et al. (2008) o biofilme dental serve de importante reservatório para patógenos respiratórios em pacientes sob ventilação mecânica. Munro et al. (2006) também demonstraram a relação das condições da saúde bucal e desenvolvimento da PAV, porém Lazarevic et al. (2014) em estudo recente sugerem que a correlação do status de higiene oral e PAV ainda é divergente.

Em síntese, nosso estudo verificou a presença dos patógenos periodontais nos indivíduos dentado e desdentado, e uma condição periodontal desfavorável ao entrar na UTI. Logo, podemos inferir que os cuidados na higienização bucal na UTI podem minimizar e evitar a colonização de bactérias periodonto patogênicas e, conseqüentemente, diminuir o risco para futuras doenças.

2.5 CONCLUSÃO



2.5 CONCLUSÃO

Este estudo evidenciou que pacientes criticamente enfermos adentraram a Unidade de Terapia Intensiva, apresentando condições periodontais desfavoráveis prévias à internação. No exame microbiológico, foi verificado maior presença dos microrganismos *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* no grupo dentado, enquanto o grupo dos desdentados apresentou maior quantidade de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, o que sugere que mesmo na ausência dos dentes, o ambiente bucal funciona como reservatório propício para a formação e desenvolvimento de um biofilme com grande potencial patogênico.



UNIVERSIDADE DE GUARAPUAVAS



2.6 REFERÊNCIAS

2.6 REFERÊNCIAS

- AAS, J. A. et al. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 29, n. 11, p.5721-32, Nov. 2005.
- AINAMO, J.; BAY, I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int. Dent. J.**, v. 25, n. 4, p. 229-35, Dec. 1975.
- ARAUJO, M. W. et al. Reproducibility of probing depth measurement using a constant-force electronic probe: analysis of inter- and intraexaminer variability. **J. Periodontol.**, v. 74, n. 12, p. 1736-40, Dec. 2003.
- BERRY, et al. Systematic literature review of oral hygiene practices for intensive care patients receiving mechanical ventilation. **Am. J. Crit. Care**, v. 16, p. 552-62, Nov. 2007.
- BINKLEY, C. et al. Survey of oral care practices in US intensive care units. **Am. J. Infect. Control.**, v. 32, n. 3, p. 161-9, May 2004.
- BROWN, L.; BRUNELLE, J.; KINGMAN, A.; Periodontal status in the United States, 1988–1991: prevalence, extent, and demographic variation. **J. Dent. Res.**, v. 75, p. 672-83, Feb. 1996.
- CORTELLI, S. C. et al. Clinical status and detection of periodontopathogens and *Streptococcus mutans* in children with high levels of supragingival biofilm. **Braz. Oral. Res.**, v. 23, n. 3, p. 313-8, Jul./Set. 2009.
- CORTELLI, S. C. et al. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in unstimulated saliva of patients with chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 2, p. 204-9, Feb. 2005.
- CRAVEN, D. E; STEGER, K. A. Epidemiology of nosocomial pneumonia. New perspectives on na old disease. **Chest**. v. 108, suppl. 2, p. 1-16, Aug. 1995. Supplement.
- DANSER, M. M. et al. Short-term effect of full-mouth extraction on periodontal pathogens colonizing the oral mucous membranes. **J. Clin. Periodontol.**, v. 21, n. 7, p. 484-9, Aug. 1994.
- DANSER, M. M.; VAN WINKELHOFF, A. J.; VAN DER VELDEN, U. Periodontal bacteria colonizing oral mucous membranes in edentulous patients wearing dental implants. **J. Periodontol.**, v. 68, n. 3, p.209-16, Mar. 1997.
- DEVIDES, S. L.; FRANCO, A. T. M. Evaluation of peri-implant microbiota using the polymerase chain reaction in completely edentulous patients before and after placement of implant-supported protheses submitted to immediate load. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants.**, v. 21, n. 2, p. 262-9, Mar./Apr. 2006.
- DI RIENZO, J. M. et al. Specific genetic variants of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* correlate with disease and health in a regional population of families with localized juvenile periodontitis. **Infect. Immun.**, v. 62, p. 3058-65, 1994.

DIAMANTI-KIPIOTI, A. et al. A radiographic survey of periodontal conditions in Greece. **J. Clin. Periodontol.** v. 22, n. 5, p. 385-90, May 1995.

FAGHRI, J. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in chronic periodontitis by multiplex PCR. **Pak J. Biol. Sci.**, v. 10, n. 22, p. 4123-7, Nov. 2007.

FERNANDES, C. B. et al. Do elderly edentulous patients with a history of periodontitis harbor periodontal pathogens? **Clin. Oral Implants. Res.**, v. 21, n. 6, p. 618-23, Jun. 2010.

GASPARETTO, A. et al. Aderência de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* às células epiteliais bucais: estabilidade e aspectos ultra-estruturais. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 14, n. 4, p. 311-8, Out./Dez. 2000.

HEO, S. M. et al. Genetic relationships between respiratory pathogens isolated from dental plaque and bronchoalveolar lavage fluid from patients in the intensive care unit undergoing mechanical ventilation. **Clin. Infect. Dis.**, v. 15, n. 47, p. 1562-70, Dec. 2008.

JONES, D. J.; MUNRO, C. L.; GRAP, M. J. Natural history of dental plaque accumulation in mechanically ventilated adults: A descriptive correlational study. **Intensive Crit. Care Nurs.**, v. 27, n. 6, p. 299-304, Dec. 2011.

KISHI, M. et al. Relationship between oral status and prevalence of periodontopathic bacteria on tongues of elderly individuals. **J. Med. Microbiol.**, v. 59, p. 1354-9, Nov. 2010.

KOLLEF, M. H. Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. **Crit Care Med.**, v. 32, n. 6, p. 1396-405, Jun. 2004.

LAMMEL, C. W. et al. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 3, p. 1196-9, Mar. 2000.

LAZAREVIC, V. et al. Challenges in the culture-independent analysis of oral and respiratory samples from intubated patients. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, v. 24, n. 4, p. 65, May 2014.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.**, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec. 2001.

LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S. B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodont.**, v. 36, p. 177-87, May/Jun. 1965.

LÓPEZ, N. J.; SMITH, P.C .; GUTIERREZ, J. Higher risk of preterm birth and low birth weight in women with periodontal disease. **J. Dent. Res.**, v.81, n.1, p. 58-63, Jan. 2002.

MENG, S. et al. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese chronic periodontitis patients and periodontally healthy adults. **Quintessence Int.**, v.

40, n. 1, p. 53-60, Jan. 2009.

MINEOKA, T. et al. Site-specific development of periodontal disease is associated with increased levels of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in subgingival plaque. **J. Periodontol.**, v. 79, n. 4, p. 670-6, Apr. 2008.

MORROW, L. E.; KOLLEF, M. H.; CASALE, T. B. Probiotic prophylaxis of ventilator-associated pneumonia: a blinded, randomized, controlled trial. **Am. J. Res. Crit. Care Med.**, v. 182, n. 8, p. 1058-64, Oct. 2010.

NEEDLEMAN, I. et al. The impact of hospitalization on dental plaque accumulation: an observational study. **J. Clin. Periodontol.**, v.39, n.11, p.1011-6, Nov. 2012.

NONNENMACHER, C. et al. Real-time polymerase chain reaction for detection and quantification of bacteria in periodontal patients. **J. Periodontol.**, v. 76, n. 9, p. 1542-9, Sep. 2005.

NUNN, M. E. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. **Periodontol.** 2000, v. 32, p. 11-23, May 2003.

PAJU, S.; SCANNAPIECO, F. A. Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections. **Oral Dis.**, v. 13, n. 6, p. 508-12, Nov. 2007.

PAPAPANOU, P.; WENNSTROM, J.; GRONDAHL, K. Periodontal status in relation to age and tooth type. A cross-sectional radiographic study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 15, n. 7, p. 469-78, Aug. 1988.

RAGHAVENDRAN, K.; MYLOTTE, J. M.; SCANNAPIECO, F. A. Nursing home-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: the contribution of dental biofilms and periodontal inflammation. **Periodontol.** 2000., v. 44, p. 164-77, Mar. 2007.

RIEP, B. et al. are putative periodontal pathogens reliable diagnostic markers? **J. Clin. Microbiol.**, v.47, n.3, p.1705-1711, Jun. 2009.

SACHDEO, A.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S. Biofilms in the edentulous oral cavity. **J. Prosthodont.**, v. 17, n. 5, p. 348-56, Jul. 2008.

SAITO, T. et al. Exposure of *P. gingivalis* to noradrenaline reduces bacterial growth and elevates ArgX protease activity. **Arch. Oral Biol.**, v. 56, n. 3, p. 244-50, Mar. 2011.

SCANNAPIECO, F.A. Pneumonia in nonambulatory patients. The role of oral bacteria and oral hygiene. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.139, n.3, p. 252, Oct. 2006.

SCANNAPIECO, F. A. Role of oral bacteria in respiratory infection. **J. Periodontol.**, v. 10, n. 7, p. 793-802, Jul. 1999.

SCANNAPIECO, F. A.; MYLOTTE, J. M. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. **J. Periodontol.**, v. 67, suppl. 10, p. 1114-22, Oct. 1996. Supplement.

- SCANNAPIECO, F. A.; WANG, B.; SHIAU, H. J. Oral bacteria and respiratory infection: effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell pro inflammatory cytokine production. **Ann. Periodontol.**, v. 6, n. 1, p. 78-86, Dec. 2001.
- SOCRANSKY, S. S. et al. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, v. 25, n. 2, p. 134-44, Feb. 1998.
- TINOCO, EMB., BELDI, MI., LOUREIRO, CA. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a Brazilian population. **Eur. J. Oral Sci.**, v. 105, p. 9-14, 1997.
- VAN ASSHE, N. et al. Do periodontopathogens disappear after full-mouth tooth extraction?. **J. Clin. Periodontol.**, v. 36, n. 12, p. 1043-7, Dec. 2009.
- WARA-ASWAPATI, N. et al. Red bacterial complex is associated with the severity of chronic periodontitis in a Thai population. **Oral. Dis.**, v. 15, n. 5, p. 354-9, Jul. 2009.
- WEIDLICH, P. Association between periodontal diseases and systemic diseases. **Braz. Oral Res.**, v. 22, suppl. 1, p. 32-43, Aug. 2008. Supplement.
- YEN, M. S. Y. **Efeito do laser de Diodo de 808nm como coadjuvante ao tratamento periodontal na redução de periodontopatógenos.** 2009. Dissertação (Mestrado em Periodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- ZAMBON, J. J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. **J. Periodontol.**, v. 65, n.9, p. 892-3, Sep. 1994.

3 ANEXOS



ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido(a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável.

Desde logo fica garantido o sigilo das informações. Em caso de recusa você não será penalizado(a) de forma alguma.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: Avaliação microbiana bucal e orotraqueal de indivíduos internados em UTI.

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. José Roberto Cortelli.

Telefone para contato (inclusive ligações a cobrar): 65-3624-0177.

Pesquisadores participante: Dra. Alessandra Nogueira Porto.

Telefones para contato : 65-3624-9240.

O objetivo é avaliar a microbiota bucal e orotraqueal de indivíduos internados em UTI. Trata-se de um estudo longitudinal-observacional, com coleta de dados de pacientes internados em UTI com ou sem entubação orotraqueal. A coleta será realizada com o uso de um protocolo, sendo que as variáveis analisadas foram: sexo, idade, exame laboratorial, exame clínico periodontal, classe social e exame microbiológico. Os critérios de inclusão são todos os pacientes internados em UTI por no mínimo 72 horas. Não há nenhum risco, prejuízo, desconforto ou lesões que podem ser provocados pela pesquisa. Para avaliação da classe social será utilizada a Escala da ABEP.

◆ Nome e Assinatura do pesquisador: Alessandra Nogueira Porto.

◆ CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo _____, como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido o sigilo das informações e que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Local e data _____ / _____ / _____ / _____ /

Nome: _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

ANEXO B – DECLARAÇÃO UNITAU



Universidade de Taubaté

Autoria Municipal de Registro Especial
 Reconhecido pelo Dec. Fed. nº 78.824/78
 Reconhecido pela Portaria CEE/CP nº 30/03
 CNPJ 40.176.109/0001-22

Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação

Comitê de Ética em Pesquisa
 Endereço: Rua Visconde do Rio Branco, 218
 Cidade Taubaté – SP – CEP 12020-040
 Telefones: 3625-4143 3625-1233
 cep@unitau.br

DECLARAÇÃO Nº 446/12

Protocolo CEP/UNITAU nº 444/12 (Esse número de registro deverá ser citado pelo pesquisador nas correspondências referentes a este projeto)

Projeto de Pesquisa: *Avaliação microbiana bucal e orotraqueal de indivíduos internados em UTI*

Pesquisador(a) Responsável: Alessandra Nogueira Porto Neves

O Comitê de Ética em Pesquisa, em reunião de **09/11/2012**, e no uso das competências definidas na Resolução CNS/MS 196/96, considerou o Projeto acima **Aprovado**.

Taubaté, 09 de setembro de 2012

Profa. Dra. Maria Dolores Alves Cocco

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Taubaté