

MON
579.61:615.28
M 528 u
TES/MEU

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

TÍTULO: Utilização de antimicrobianos, clorexidina e mercúrio e resistência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp., isolados da cavidade bucal.

GERALDO BATISTA DE MELO

579.61:615.28 M528u TES/F
DIRBI - UFU UMU 00627/97



1000167415

UBERLÂNDIA-1996



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Campus Umuarama Bloco 2E Sala 37

38.400-902, UBERLÂNDIA - MG

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

1 - TÍTULO DA TESE: Utilização de Antimicrobianos, Clorexidina e Mercúrio e Resistência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp, Isolados da Cavidade Bucal

2 - ALUNO: Geraldo Batista de Melo

3 - PROFESSOR ORIENTADOR: Paulo Pinto Gontijo Filho

4 - DATA: 13 / 12 / 96

5 - BANCA EXAMINADORA:

Titular Paulo Pinto Gontijo Filho

Titular Milton de Uzeda

Titular Ana Maria Bonetti

Suplente Malcon Antônio Manfredi Brandeburgo

Suplente Izabel Yoko Ito

6 - APRESENTAÇÃO: Início - 14:00h Término - 14:50h

7 - TEMPO DE ARGUIÇÃO: Início - 14:50h Término - 16:30h

8 - CONCEITO ATRIBUÍDO POR EXAMINADOR:

1º Membro da Banca A

2º Membro da Banca A

3º Membro da Banca A

Conceito Final: A

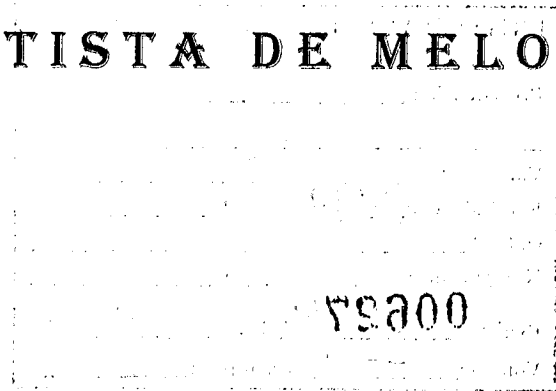
9 - OBSERVAÇÕES: _____

10 - ASSINATURA DOS MEMBROS DA BANCA:

Paulo Pinto Gontijo Filho
Milton de Uzeda
Ana Maria Bonetti

11 - RESERVADO AO COLEGIADO

GERALDO BATISTA DE MELO



UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, CLOREXIDINA E MERCÚRIO E
RESISTÊNCIA DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*
mutans E *Lactobacillus* spp., ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL.

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS.

1996

11-0

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

UTILIZAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS, CLOREXIDINA E MERCÚRIO E RESISTÊNCIA DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* E *Lactobacillus* spp., ISOLADOS DA CAVIDADE BUCAL.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE

ALUNO: GERALDO BATISTA DE MELO

ORIENTADOR: PROF. Dr. PAULO PINTO GONTIJO FILHO

UBERLÂNDIA, 1996

Melo, Geraldo Batista de 1952

Utilização de antimicrobianos, clorexidina e mercúrio e resistência de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp., isolados da cavidade bucal./ Geraldo Batista de Melo.

Uberlândia: 1996

IX, 47f. : il.

Orientador: Paulo Pinto Gontijo Filho

Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Uberlândia.

Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Bibliografia: 37-47.

1. Microrganismos - Efeitos de drogas. 2. Bactérias patogênicas.
3. Boca - microbiologia. 4. Genética bacteriana, I Universidade Federal de Uberlândia. Curso de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

CDU: 579.61:615.28

Aos meus pais,
Aos meus filhos Kellen, Michelle e Augusto,
À querida Janice,
Aos meus professores,
Aos meus alunos.

Ao Professor Dr. Paulo Pinto Gontijo Filho pelos conhecimentos científicos, amizade, paciência e incansável auxílio na orientação desta tese,

Aos Professores Coordenadores do Curso de Pós-graduação em Genética e Bioquímica,

Aos Professores de Microbiologia da UFU, meus colegas, que muito colaboraram e estimularam, Ângela, Fábio e Vívian,

Aos técnicos do laboratório de Microbiologia da UFU, Claudete e Ricardo pela colaboração,

Aos alunos estagiários

Meus agradecimentos.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO.....	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Pacientes:.....	8
3.2. Técnicas Microbiológicas.....	8
3.2.1. Coleta de Material.....	8
3.2.2. Isolamento dos Microrganismos:	8
3.2.3. Identificação.....	9
3.2.3.1. <i>E. coli</i>	9
3.2.3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Staphylococcus</i> spp.....	9
3.2.3.3. <i>Lactobacillus</i> spp.	9
3.2.3.4. <i>Streptococcus mutans</i>	9
3.2.4. Estocagem:.....	10
3.2.5. Avaliação <i>in vitro</i> da susceptibilidade aos antimicrobianos.....	10
3.2.5.1. Antimicrobianos.	10
3.2.5.1.1. Técnica de difusão em gel.....	10
3.2.5.1.2. Técnica de concentração inibitória mínima (CIM).....	10
3.2.5.1.3. Teste da concentração inibitória mínima pelo método <i>E-TEST</i> . 11	
3.2.5.2. Antissépticos	12
3.2.6. Transmissão de Resistência aos antimicrobianos por conjugação.....	12
3.2.6.1. Técnica utilizando caldo:	12
3.2.6.2. Técnica utilizando Millipore	13
4. RESULTADOS	14
5. DISCUSSÃO.....	24
6. CONCLUSÕES.....	34
7. SUMMARY	35
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37

RESUMO

O objetivo dessa investigação foi realizar um estudo caso-controle do impacto do uso de antimicrobianos, clorexidina e mercúrio, na resistência de microrganismos de interesses médico e odontológico (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp.) presentes na cavidade bucal. Foram testados quatro grupos, com dez voluntários cada, a saber: A- com múltiplas restaurações à amálgama, B- em uso de antimicrobianos, C- em uso de digluconato de clorexidina a 0,12% em bochechos diários e D- sem história de cárie dentária (controle). O monitoramento microbiológico foi realizado durante quatro semanas. A resistência foi determinada, *in vitro*, pelas técnicas de difusão em gel para antimicrobianos e de diluição em agar, para os antimicrobianos, digluconato de clorexidina e cloreto de mercúrio. Os experimentos de transferência de resistência foram realizados pelas técnicas de cultivo em caldo e de filtragem em membrana, utilizando *E. coli* K12 como receptora.

Uma colonização importante por Enterobacteriaceae foi detectada no grupo em uso de antimicrobianos (50%) e controle (40%). A espécie mais frequente entre os isolados foi *E. coli*, particularmente no grupo B (6/11) onde um terço desses microrganismos foi multirresistente. Nesse grupo, as CIM_s para gentamicina foram de 64 mg/L contra 4 mg/L no grupo controle. As estirpes desses microrganismos foram resistentes à clorexidina e cloreto de mercúrio, independente de grupo.

A colonização por *Staphylococcus aureus* no grupo B foi de 50%, enquanto que a observada no grupo D foi de 30%, ocorrendo ainda um aumento

da colonização em função do tempo de uso de antimicrobianos. No grupo B, os isolados desse microrganismo, assim como os de *Staphylococcus* spp., mostraram-se resistentes à oxacilina ($CIM_{s\ 90} >512$ mg/L). Esses microrganismos, independente do grupo, foram susceptíveis à clorexidina e resistentes ao cloreto de mercúrio, mas com CIM_s em relação ao mercúrio, três vezes mais elevadas para aquelas dos grupos com restaurações ou em uso de antimicrobianos.

No grupo de voluntários em uso regular de clorexidina, *Streptococcus mutans* foi o microrganismo mais afetado. A resistência simultânea a vários antimicrobianos, particularmente à ampicilina, foi mais comum no grupo B (8/10) observando-se $CIM_{90} >512$ mg/L. Os isolados dessa espécie foram susceptíveis à clorexidina e mercúrio, excetuando-se duas estirpes do grupo B.

As estirpes de *Lactobacillus* spp. estudadas foram susceptíveis à penicilina-G, clorexidina e mercúrio.

As concentrações inibitórias mínimas calculadas pelo teste E para gentamicina (Enterobacteriaceae) oxacilina (estafilococos) ampicilina (*Streptococcus mutans*) e penicilin-G (*Lactobacillus* spp.) apresentaram concordância com a técnica clássica, excetuando-se um isolado de MRSA que se apresentou susceptível com esta técnica.

Os experimentos de conjugação com os isolados de Enterobacteriaceae lactose positiva apresentaram sucesso em sete dos oito realizados, porém, com apenas dois transconjugantes, revelando as duas marcas de resistência.

1. INTRODUÇÃO

O aparecimento dos antibióticos a partir da década de quarenta teve um impacto significativo no controle de doenças infecciosas (COHEN, 1992). Atualmente, a escolha de um agente antibiótico apropriado tornou-se mais complexa em função do número elevado disponível comercialmente e do custo da terapia, particularmente nos países subdesenvolvidos. Embora haja controvérsias no tocante às várias questões, os princípios gerais para a seleção do antibiótico devem considerar sobretudo o microrganismo, o paciente e o sítio de infecção (NEU, 1992).

A descoberta de cada antibiótico tem sido seguida do seu uso em grande escala, resultando na seleção de microrganismos resistentes após a introdução de cada antimicrobiano (KUNIN, 1993).

O uso desses medicamentos merece atenção nos países subdesenvolvidos, devido à frequência proporcionalmente maior de indivíduos com doenças infecciosas, à facilidade com que são adquiridos na comunidade, ao seu emprego pouco judicioso e ao peso nos orçamentos relativos à gastos com saúde (KUNIN *et al.*, 1990; KUNIN, 1993).

Entre as consequências negativas do uso de antimicrobianos, destacam-se: seleção de amostras resistentes com implicações ecológicas e epidemiológicas, risco de superinfecção, maior incidência de efeitos colaterais e aumento do custo de assistência médico-hospitalar (NEU, 1992; KUNIN, 1993).

O uso de agentes antimicrobianos produz uma pressão seletiva que promove o surgimento de microrganismos resistentes e predispõe os pacientes à colonização pelos mesmos (EMORI & GAYES, 1993). Em condições normais, a presença, no orofaringe, de membros de Enterobacteriaceae e outros bastonetes

Gram-negativos, referidos como entéricos, é pouco frequente (JOHANSON *et al.*, 1969). Entretanto, esses microrganismos são comuns em pacientes gravemente enfermos, sendo ainda maior quando estão usando antibióticos (VALENTI *et al.*, 1978; EICKHOFF, 1979). A colonização, além de representar risco para o próprio paciente, em termos de infecção ou superinfecção (JOHANSON *et al.*, 1969; BAKER *et al.*, 1985). Cria um reservatório de fatores de resistência (plasmídeos) no ambiente hospitalar (WILLIAMS, 1982).

O uso extensivo de antimicrobianos que são adquiridos livremente em farmácias, somados à higiene precária e à falta de saneamento básico, tem contribuído, particularmente nos países em desenvolvimento, para aumentar a participação de bactérias resistentes na etiologia de infecções comunitárias. O *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina, o *Streptococcus pneumoniae* e *Neisseria gonorrhoeae* resistentes às penicilinas, *Haemophilus influenzae* resistente à ampicilina, *Shigella* spp. e *Salmonella typhi* resistentes à ampicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetropina e *Mycobacterium tuberculosis* resistente à isoniazida e rifampicina, estão entre alguns exemplos importantes (NEU, 1992).

Os antimicrobianos tem influenciado as tendências dos microrganismos mais associados à etiologia de infecções hospitalares. Usualmente, como foi referido anteriormente, a introdução de um novo antibiótico ou quimioterápico é seguida pelo desenvolvimento de resistência bacteriana ao mesmo e/ou o favorecimento de um microrganismo (EMORI & GAYES, 1993). A partir da década passada as bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* resistentes à oxacilina e o *Enterococcus* spp., vem assumindo importância crescente, como resultado do uso de cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração (BRUMFITT & HAMILTON-MILLER,

1989; BOYCE, 1992; GRAY & PEDLER, 1992). No entanto, bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* ainda persistem como importantes patógenos hospitalares, correntemente, multirresistentes (BAILLIE, 1989; COHEN, 1992).

A resistência a esses agentes pode ser determinada por genes cromossômicos ou localizados nos plasmídeos (FARNER III & KELLY, 1991; THA, 1993). Os mecanismos de resistência mais significativos incluem a sua inativação por enzimas específicas, alteração dos sítios ativos aos quais eles se combinam e à diminuição da permeabilidade quando da penetração no envoltório bacteriano (NEU, 1992).

As bactérias tornam-se resistentes aos antimicrobianos como resultado de uma mutação gênica ou, usualmente, da transferência de material genético por transdução ou conjugação. A conjugação, com passagem de plasmídeos de uma célula doadora para uma receptora, é particularmente comum entre os gêneros de Enterobacteriaceae e *Pseudomonas*. O acúmulo de diversos genes de resistência nos plasmídeos decorre sobretudo da transferência de elementos genéticos móveis denominados transposons. (BRYAN, 1988; JACOBY & ARCHER, 1991).

A ampla disseminação da resistência bacteriana observada atualmente é resultante, sobretudo, da transferência horizontal de plasmídeos por meio de conjugação, esse processo é mais frequente entre bactérias Gram-negativas, onde ocorre de forma promíscua, entre representantes de gêneros e famílias diferentes, mas também foi descrito entre amostras do gênero *Staphylococcus* (COHEN, 1992). Espécies de bactérias Gram-positivas podem transferir genes de resistência às Gram-negativas, mas o reverso não é comum (NEU, 1992; MUHAMMAD *et al.*, 1993).

A resistência bacteriana aos germicidas (antissépticos e desinfetantes) ao contrário do observado frente aos antimicrobianos, tem sido pouco estudada (STICKLER *et al.*, 1983; RUSSELL *et al.*, 1986). Na maioria das vezes ela está associada à resistência intrínseca, usualmente atribuída à constituição da parede celular das bactérias (MANIELLO *et al.*, 1979; BERKELMAN *et al.*, 1984) sendo frequentemente utilizado para o microrganismo que não é susceptível aos antissépticos e desinfetantes, normalmente usados na prática (RUSSELL *et al.*, 1986; RUSSELL *et al.*, 1987).

Há muitos relatos de isolamento de bactérias contaminando sabões que contêm antissépticos, situações referidas muitas vezes como pseudosurtos, pois os achados de laboratório mostram nenhuma relação com a clínica, mas são evidências de risco potencial de aquisição de infecções pós cirúrgicas, de bacteremias e peritonites (LOWBURY, 1951; STICKLER & THOMAS, 1980).

Resistência de bactérias Gram-negativas à clorexidina foi relatada para *Pseudomonas* spp., *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis* e *Providencia stuartii*, com amostras isoladas de urina e meato urinário de pacientes com sonda de demora, em uso prolongado desse antisséptico, apresentando concentração inibitória mínima (CIM) acima de 800 mg/L (STICKLER & THOMAS, 1980).

BRUMFITT *et al.*, (1985) relataram que a CIM de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) para a clorexidina era quatro vezes maior do que o correspondente às amostras susceptíveis. PEARMAN *et al.*, (1985) verificaram que o tratamento tópico com este antisséptico não eliminou sua presença, em portadores. Embora o *Staphylococcus aureus* seja usualmente susceptível à maioria dos antissépticos e desinfetantes, na última década foram isolados amostras resistentes a alguns germicidas,

suscitando especulações sobre sua importância na epidemiologia de infecção por MRSA (MILLNS *et al.*, 1994).

O uso de clorexidina em Odontologia vem aumentando, sendo atualmente um dos antissépticos de escolha para o controle da microbiota da placa supragengival, sendo eficaz na prevenção da cárie dentária, gengivite, estomatite e lesão aftosa. Adicionalmente, é também utilizado na lavagem de mãos (SENIOR, 1973; AINAMO, 1977; LOWBURY *et al.*, 1974; GARDNER & GRAY, 1983). No entanto, não há registro de emergência de estafilococos resistentes como resultado dessas práticas (MILLNS *et al.*, 1994).

A associação entre resistência a antibióticos e antissépticos, com possíveis implicações epidemiológicas em função do uso mais frequente do primeiro grupo de agentes, foi evidenciada em *Staphylococcus aureus* e em bastonetes Gram-negativos, com o grupo de detergentes catiônicos. Observações semelhantes também foram notadas em relação aos metais pesados como o mercúrio e a prata (SUTHERLAND *et al.*, 1985; MARTINS *et al.*, 1991).

Entre os materiais mais utilizados em restaurações dentárias está o amálgama, que libera mercúrio na forma de Hg^0 , prontamente absorvido quando inalado, mas parte é dissolvido na saliva, deglutido e absorvido no tracto intestinal (WHO, 1991). Em populações com muitos trabalhos em amálgama, a possibilidade de exposição aumentada ao mercúrio inorgânico com possíveis efeitos tóxicos tem sido investigada (SALLSTEN *et al.*, 1996). Entretanto o seu efeito pressor, favorecendo a emergência de bactérias da microbiota bucal não tem merecido atenção, apesar da sua ampla distribuição em microrganismos de ambientes hospitalares e não hospitalares, resultante de outras formas de uso (BLOCK, 1983).

A caracterização genética de resistência ao mercúrio, bem como a outros íons metálicos, associada à resistência à meticilina e outros antibióticos, em *Staphylococcus aureus*, está bem estabelecida, sendo determinada por transposons e plasmídeos e disseminada no ambiente hospitalar por meio de bacteriófagos (MILLAR et al., 1987; POSTON & LI SAW HEE, 1991). Entre bactérias Gram-negativas, a resistência simultânea aos antibióticos e mercúrio mediada por plasmídeos já foi descrita em *Pseudomonas aeruginosa* (CHOPRA, 1982). No Brasil, MARTINS, SILVA & GONTIJO FILHO (1991), também relataram essa associação em amostras desse microrganismo de origem hospitalar, sem no entanto isolar e caracterizar os plasmídeos.

2. OBJETIVO

Estudo caso-controle do impacto do uso de antimicrobianos, clorexidina e mercúrio na resistência de microrganismos de interesses médico e odontológico (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp.) presentes na microbiota da cavidade bucal.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Pacientes: Foram testados quatro grupos de voluntários, de pacientes do Hospital Odontológico, Hospital de Clínicas e alunos do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, distribuídos nos grupos: A - 10 indivíduos com múltiplas restaurações dentárias à base de amálgama (liga Prata/Mercúrio) selecionados entre pacientes do Hospital Odontológico, B -10 indivíduos em uso de antimicrobianos, do Hospital de Clínicas, C -10 indivíduos em uso de solução de digluconato de clorexidina a 0,12%, em bochechos diários, após a última higienização noturna e D -10 indivíduos sem história de cárie dentária clínica e sem uso de antimicrobianos e antissépticos (grupo controle).

Os voluntários pertencentes aos grupos C e D, foram estudantes do Curso de Odontologia da UFU.

3.2. Técnicas Microbiológicas

3.2.1. Coleta de Material

Foram realizadas quatro coletas com *swab*, de material da cavidade oral, em cada indivíduo, nas superfícies dentárias, dorso da língua e bochechas, por quatro semanas consecutivas. O material foi transportado rapidamente para o laboratório.

3.2.2. Isolamento dos Microrganismos

Foram utilizados os seguintes meios de cultura: Agar MacConkey (Oxoid) Agar Manitol Salgado (Oxoid) Agar Rogosa (Merck) e Agar Mitis-salivarius (Difco)

contendo 20% de sacarose e bacitracina 0,2 UI por mL, para o cultivo de *E. coli* *Staphylococcus* spp. *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* do grupo *mutans* respectivamente. As culturas foram incubadas à temperatura de 37°C por 48 horas, sendo mantidas em tensão de aproximadamente 5-8% CO₂ nos dois últimos (Agar Rogosa e Mitis-salivarius) Foram selecionadas três colônias, com base na morfologia dos microrganismos referidos, a partir de cada cultura realizada. O cultivo para isolamento de *Lactobacillus* spp. foi realizado pela técnica *pour plate* (ROGOSA *et al.*, 1951; GOLD, *et al.*, 1973).

3.2.3. Identificação

3.2.3.1. *E. coli*

Foram caracterizadas por meio dos seguintes testes bioquímicos: lactose em Agar MacConkey, em Agar triplice açúcar (TSI), Citrato de Simmons, Ureia, Agar Lisina ferro (LIA), Agar Lisina descarboxilase (LDC), Indol, motilidade e H₂S (SIM) (MAC FADDIN, 1980).

3.2.3.2. *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus* spp.

Identificadas pelas provas bioquímicas de fermentação de manitol em Agar Manitol Salgado e teste da coagulase (KLOOS & LAMB, 1991).

3.2.3.3. *Lactobacillus* spp.

Identificados pelos testes bioquímicos de fermentação de manitol e sorbitol (ROGOSA *et al.*, 1951)

3.2.3.4. *Streptococcus mutans*

Foram realizados os testes bioquímicos de fermentação de manitol e sorbitol (GOLD *et al.*, 1973).

3.2.4. Estocagem

As amostras selecionadas foram estocadas em Agar Estoque, para posterior realização dos testes de susceptibilidade, *in vitro*, aos antimicrobianos e antissépticos.

Agar Estoque: Agar 0,4g, Peptona 1,0g, Extrato de carne 5g, Cloreto de sódio 0,5g, Água qsp. 100mL, pH 7,2.

3.2.5. Avaliação *in vitro* da susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.2.5.1. Antimicrobianos.

3.2.5.1.1. Técnica de difusão em ágar

foi testada a susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos pela técnica de difusão em gel (NCCLS, 1993a) utilizando-se discos (CECON) dos seguintes antimicrobianos:

E. coli- Ampicilina, Tetraciclina, Gentamicina, Cefalotina e Sulfametoxazol-trimetoprina,

S. aureus- Ampicilina, Tetraciclina, Oxacilina e Eritromicina,

S. mutans- Ampicilina, Tetraciclina, Gentamicina, Cloranfenicol e Eritromicina,

Lactobacillus spp.- Penicilina G, Ciprofloxacina, Clindamicina, Cloranfenicol e Cefoxitina.

Foram empregados como controle as amostras de: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923 (do laboratório de Microbiologia da UFU) e *S. mutans* B3 (Amostra gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Milton de Uzeda, UFRJ).

3.2.5.1.2. Técnica de concentração inibitória mínima (CIM)

a) Meio de cultura com antimicrobianos : Amostras dos quatro microrganismos foram testadas quanto à susceptibilidade à Gentamicina (Enterobacteriaceae)

Oxacilina (*S. aureus*) Ampicilina (*S. mutans*) e à Penicilina G (*Lactobacillus*) segundo metodologia do NCCLS (1983) utilizando-se as seguintes concentrações desses antibióticos no meio de agar Muller-Hinton:

Gentamicina (Sigma, USA); 0,03-0,06-0,125-0,25-0,5-1-2-4-8-16-32-64-128-256-512 mg/L de meio de cultura..

Oxacilina (Biochimico, São Paulo, Brasil) 0,03-0,06-0,125-0,25-0,5-1-2-4-8-16-32-64-128-256-512 mg/L.

Ampicilina (Biochimico, São Paulo, Brasil) 0,03-0,06-0,125-0,25-0,5-1-2-4-8-16-32-64-128-256-512 mg/L.

Penicilina G (Sigma, USA) 0,03-0,06-0,125-0,25-0,5-1-2-4-8-16-32-64-128-256-512 mg/L.

b) Inóculo: As amostras foram cultivadas em caldo tripticase soja a 37°C por 24 horas e padronizadas segundo o tubo 0,5 da escala de McFarland, quanto à turbidez, de forma a conter 10⁸UFC/mL.

c) Semeadura, leitura e interpretação: As diversas suspensões foram inoculadas com aplicador de Steers, com 10⁴ UFC por *spot*, nos meios de agar Muller-Hinton, com e sem (controle) as diferentes concentrações de antimicrobianos, clorexidina e cloreto de mercúrio (STERRS *et al.*, 1959; PERES *et al.*, 1991). As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e o CIM interpretado como o da placa onde a leitura não evidenciou a presença de crescimento. A CIM de cada agente foi considerado em mg/L.

3.2.5.1.3. Teste da concentração inibitória mínima pelo método *E-TEST*^R (AB Biodisk, Solma, Suécia).

O *E-TEST* consiste em uma fita plástica (50x5mm) contendo concentrações predefinidas do antimicrobiano, que rapidamente se difunde a partir da fita para produzir um gradiente contínuo exponencial de concentração da droga no meio, correspondendo a 15 valores de concentração inibitória mínima convencional. Ao

invés de uma zona de inibição circular, a fita fornece uma zona de forma elíptica e a concentração inibitória mínima do antimicrobiano é fornecida pela leitura do valor que se encontra no ponto de intercessão da escala na fita com a zona de inibição de crescimento bacteriano. A versatilidade e facilidade de uso do *E-TEST* torna este método uma excelente alternativa às técnicas convencionais, sendo particularmente útil para determinar o nível de resistência a um antimicrobiano (BOLMSTROM *et al.*, 1988).

O inóculo foi feito com *swab* a partir de suspensão padronizada segundo a escala 0,5 de McFarland em placa de Agar Mueller-Hinton (Oxoid) de modo a obter um crescimento confluyente. As placas foram deixadas secar durante 15 minutos, antes da aplicação de uma fita contendo o antimicrobiano, uma para cada teste. A leitura foi realizada após incubação a 37°C durante 18-24 horas.

3.2.5.2. Antissépticos:

A técnica de concentração inibitória mínima foi realizada como descrito no item 3.2.5.1.2. com as seguintes concentrações:

a) Digluconato de clorexidina (ADA- Produtos Farmacêuticos São Paulo) 0,03-0,06-0,12-0,25-0,5-1-2-4-8-16-32-64-128-256 e 512mg/L, e b) Cloreto de Mercúrio (ADA- Produtos Farmacêuticos São Paulo) 0,03-0,06-0,12-0,25-0,5-1-2-4-8-16-32-64-128-256 e 512mg/L.

3.2.6. Transmissão de Resistência aos antimicrobianos por conjugação.

3.2.6.1. Técnica utilizando caldo

Cada uma das amostras de Enterobacteriaceae isoladas, doadora potencial, foi cultivada em caldo Trypticase Soja (BBL) durante a noite, com incubação a 37°C, bem como a cepa de *E. coli* K12 (receptora) com as seguintes características:

lactose negativa, resistencia à 100 mg/L de ácido nalidíxico e susceptível à cefalotina e gentamicina. Volumes de 0,5 mL e 4,5 mL das amostras receptora e doadora, respectivamente, foram cultivadas em 5 mL de caldo à 37°C, por 20 horas, sem agitação; a seguir, 0,2 mL, foram transferidos para agar MacConkey, contendo 50 mg/L do antibiótico ao que a doadora foi resistente. Após incubação a 37°C por 24 horas, um número correspondente à, aproximadamente, 5 a 10 colônias não fermentadoras de lactose, foram retestadas em agar Muller-Hinton frente ao antimicrobiano para o qual o transconjugante foi resistente no cultivo primário LINTON *et al.*, 1972).

3.2.6.2. Técnica utilizando Millipore (Sigma, USA).

Amostras doadoras e receptora (*E. coli* K12) foram cultivadas, em separado, em 4mL de caldo tripticase soja, durante a noite, a 37°C. Uma mistura de 1 mL da amostra doadora e 3 mL da receptora foi filtrada em membrana de nitrocelulose estéril, com poros de 0,45 micrômetros. O filtro foi transferido para placas com agar tripticase soja, incubado por 6 horas à 37°C, removido da superfície do agar e colocado em um tubo estéril. As células microbianas foram retiradas da membrana pela adição de 1 mL de caldo tripticase soja e agitação em *Mixer Vortex*. A suspensão resultante foi diluída a 10^2 , 10^4 , 10^6 e 10^8 em salina e volumes de 0,1 mL de cada diluição foram incubados na superfície de agar MacConkey, contendo os antimicrobianos adequados para obtenção dos transconjugante. Como controle, as amostras doadora e receptora foram semeadas, similarmente, em agar MacConkey, com os antimicrobianos (FORBES & SCHABERG, 1983).

4. RESULTADOS

A frequência de isolados de microrganismos (Enterobacteriaceae, staphylococci, *S. mutans* e *Lactobacillus* spp.) nos quatro grupos de voluntários (A- múltiplas restaurações à amálgama, B- em uso de antimicrobianos, C- em uso de digluconato de clorexidina a 0,12% e D- indivíduos sem história de cárie dentária) foi respectivamente, a seguinte: Grupo A: 2,5 - 37,5 - 97,5 e 72,5%; B: 27,5 - 30,0 - 65,0 e 57,5%; C: 0 - 15,0 - 7,5, e 12,5% e D: 17,5 - 30,0 - 87,5 e 22,5%, como mostrado na Tabela 1.

TABELA-1 Distribuição das bactérias isoladas nos quatro grupos de voluntários

Microrganismos Grupos	Enterobacteriaceae	estafilococos		<i>S. mutans</i>	<i>Lactobacillus</i> spp
		<i>S. aureus</i>	Outros		
A(amálgama)	1(1)*	2(4)	8(11)	10(39)	9(29)
B(antimicrobiano)	5(11)	5(9)	2(3)	9(26)	7(23)
C(clorexidina)	---	1(1)	5(5)	3(3)	4(5)
D(controle)	4(7)	3(6)	4(6)	10(35)	5(9)
Total	10(19)	11(20)	19(25)	32(103)	25(66)

*Pacientes(isolados)

O grupo B foi o que apresentou uma proporção maior (50%) de Enterobacteriaceae com um predomínio de *E. coli* (8/19) seguido de bactérias da tribo *Klebsiellae* (7/19) (Tabela 2) e *S. aureus*. A presença de Enterobacteriaceae e *S. aureus*, também, foi expressiva no grupo D, com 40% e 30% respectivamente. Com relação aqueles de importância odontológica (*S. mutans* e *Lactobacillus* spp.) as frequências em todos os grupos foram $\geq 50\%$, exceto no grupo C (Tabela 1).

TABELA-2 Distribuição de isolados da família Enterobacteriaceae nos quatro grupos de voluntários

Gêneros/espécies Grupos	<i>E. coli</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp	Outros
A(amálgama)	1(1)*	--	--	--
B(antimicrobianos)	4(6)	3(4)	--	1(1)
C(clorexidina)	--	--	--	--
D(controle)	1(1)	1(1)	1(2)	2(3)
Total	5(8)	4(5)	1(2)	3(4)

*Pacientes(isolados)

Considerando o total de isolados obtidos no decorrer das quatro semanas, os números daqueles de *S. mutans* e *Lactobacillus* spp. no grupo C em uso de clorexidina, foram os mais inexpressivos, conforme os dados que estão na Tabela 3; os isolados (9) de *Lactobacillus* spp. nos voluntários do grupo D também foram baixo (5/40) como o observado no grupo de estudantes em uso de antisséptico (Tabela 3).

TABELA-3 Distribuição das bactérias de interesse médico e odontológico, nos voluntários, em função do tempo

Microrganismos Tempo	Enterobacteriaceae				<i>S. aureus</i>				<i>S. mutans</i>				<i>Lactobacillus</i> spp.			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Grupos	(semanas)				(semanas)				(semanas)				(semanas)			
A (amálgama)	0	1	0	0	1	1	1	1	10	9	10	10	6	8	7	8
B (antimicrobiano)	4	2	2	3	0	2	3	4	6	6	7	7	6	6	5	6
C (clorexidina)	0	0	0	-*	0	0	1	-	0	0	3	-	4	0	1	-
D (controle)	2	2	2	1	1	2	3	0	10	8	9	8	2	3	1	3

* Não houve a quarta coleta de espécimes

No que concerne a resistência aos antimicrobianos, avaliada pela técnica de difusão em gel, entre os 19 isolados da família Enterobacteriaceae, nenhum mostrou susceptibilidade, com 6 (33%) multirresistentes, ou seja, resistentes a 2 ou mais antimicrobianos de grupos distintos, sendo a maioria (4/6) provenientes

de pacientes em uso de antimicrobianos, e resistentes a todos antimicrobianos testados. No grupo controle o número de Enterobacteriaceae multirresistentes foi inferior (3/7). Estes dados são apontados na Tabela 4, bem como os obtidos para staphylococci. Com relação a esse microrganismo, obteve-se 43 isolados sendo 20 de *S. aureus* e 23 *Staphylococcus* spp., todos resistentes, excetuando-se um (*Staphylococcus* spp.) proveniente do grupo controle. A metade (10/20) das culturas de *S. aureus* foi resistente à oxacilina, comportando-se portanto, como (MRSA), sendo nove isolados do grupo B e um do C. Apenas 13% (3/23) daqueles de *Staphylococcus* spp. foram resistentes à essa penicilina β -lactamase resistente (Tabela 4).

TABELA-4 Resistência dos isolados de Enterobacteriaceae e staphylococci aos antimicrobianos, detectada pela técnica de difusão em gel.

Grupo	Resistogramas ^a	Enterobacteriaceae (N=19)	Resistogramas	<i>S.aureus</i> (N=20)	<i>Staphylococcus</i> spp. (N=23)
A	CF+AP	1	AP+EI+TT	1	2
			AP+TT	2	2
			AP	1	6
B	GN+CF+SFT+AP+TT	4	AP+EI+OX+TT	9	2
	CF+ AP	7	AP+OX+TT	0	1
C	---	---	AP+EI+OX+TT	1	0
			AP+EI	0	1
			AP+TT	0	1
			AP	0	1
			TT	0	1
D	GN+CF+SFT+AP+TT	1	AP+TT	4	4
	CF+AP+TT	1	AP	2	1
	CF+AP	3			
	AP+TT	1			
	AP	1			
Total		19(100)*		20(100)	22(95,65)

* Número de isolados resistentes(%)

^a CF= cefalotina, AP= ampicilina, GN= gentamicina, SFT= sulfametoxazol-trimetoprina, TT= tetraciclina, EI= eritromicina e OX= oxacilina

A presença de multirresistência em *S. aureus* e *Staphylococcus* spp. foi verificada em 17/20 e 13/23 das estirpes desses microrganismos, respectivamente.

Entre os 31 isolados de *Streptococcus mutans* 24 (77%) foram resistentes, incluindo todos aqueles oriundos do grupo B; dos quais 80% (8/10) eram multirresistentes. A multirresistência entre os isolados provenientes dos grupos C (2/5), A (3/10) e D (1/6) foi observada menos frequentemente. Aproximadamente 20% (7) das estirpes de *Streptococcus mutans* foram susceptíveis a todos antimicrobianos testados.(Tabela 5).

A susceptibilidade à gentamicina, clorexidina e cloreto de mercúrio dos 19 isolados de Enterobacteriaceae pela técnica de concentração inibitória mínima está na Tabela 6. Entre as estirpes do grupo B observou-se resistência à gentamicina com uma CIM₉₀ de 64 mg/L, ao contrário do grupo controle que apresentou uma CIM₉₀ de 4 mg/L. Considerando-se uma CIM₉₀ ≥50 mg/L como valor para considerar como resistente à clorexidina, a maioria dos isolados (grupos B e D) foi resistente a esse antisséptico. Isso também foi constatado para o cloreto de mercúrio (CIM ≥32 mg/L), sendo que três dos sete isolados do grupo controle cresceram na concentração de 512 mg/L (Tabela 6).

TABELA-5 Resistência dos isolados de *Streptococcus mutans* aos antimicrobianos, detectada pela técnica de difusão em gel.

Grupos	Resistogramas ^a	<i>S. mutans</i> (N=31)
A	AP+CO+EI+TT	1
	AP+EI+TT	1
	GN+EI+TT	1
	AP+EI	1
	TT	2
	Sub-total	6(60)*
B	CO+EI+TT+AP	2
	EI+TT+AP	2
	GN+TT+AP	1
	GN+CO+EI	1
	GN+EI	1
	EI+AP	1
	AP	1
	EI	1
Sub-total	10(100)	
C	GN+EI	1
	TT+AP	1
	AP	3
	Sub-total	5(100)
D	EI+TT	1
	EI	1
	TT	1
	Sub-toal	3(50)
Total		24(77)

^a GN= Gentamicina, CO= Cloranfenicol, EI= Eritromicina, TT= Tetraciclina, AP= Ampicilina.

* Número de isolados resistentes (%)

TABELA-6 Susceptibilidade de isolados de Enterobacteriaceae à gentamicina, clorexidina e cloreto de mercúrio, pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM-mg/L)

Grupos	N	Gentamicina			Clorexidina			Cloreto de mercúrio		
		variação	50%	90%	variação	50%	90%	variação	50%	90%
A	N*=1	0,25	---	---	128	---	---	16	---	---
B	N=11	0,25-64	1	64	32-128	64	128	8->512	32	32
D	N=7	0,25-4	0,25	4	2-128	64	128	8->512	16	>512

* Número de isolados

Os resultados de susceptibilidade de 40 isolados de estafilococos à oxacilina, pela técnica de concentração inibitória mínima estão na Tabela 7. Foram testadas 20 estirpes de *S. aureus*, sendo que todas (nove) provenientes de voluntários em uso de antimicrobianos, foram de MRSA, confirmando os dados da Tabela 4, enquanto aos demais (11) provenientes dos grupos A, C e D foram susceptíveis à esse antimicrobiano. Os isolados de *Staphylococcus* spp., coagulase negativos, do grupo B também tiveram sua resistência à oxacilina confirmada pela técnica de CIM, com uma CIM₉₀ > 512 mg/L; aqueles provenientes dos grupos A, C e D apresentaram uma CIM₉₀ de 0,25 mg/L:

TABELA-7 Susceptibilidade de isolados de staphylococci à oxacilina pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM- mg/L).

Grupos	N ^{oa}	<i>S.aureus</i>			N ^o	<i>Staphylococcus</i> spp.		
		oxacilina variação	50%	90%		oxacilina variação	50%	90%
A (amálgama)	4	0,03-0,5	0,25	0,5	8	0,125-0,25	0,125	0,25
B (antimicrobianos)	9	64->512	512	>512	4	0,25->512	0,25	>512
C (clorexidina)	1	0,06	---	---	3	0,125	0,125	0,125
D (controle)	6	0,03-0,25	0,125	0,25	5	0,03-0,25	0,25	0,25

^a Número de isolados

A susceptibilidade dos isolados de staphylococci à clorexidina e cloreto de mercúrio, tomando-se como resistente CIM₉₀ 0,78 mg/L e 8 mg/L, de respectivamente, para clorexidina e o sal de mercúrio (BLOCK, 1983; MILLNS *et al.*, 1994) está na Tabela 8. O comportamento dos isolados de todos os grupos de voluntários, frente à clorexidina, foi semelhante e apresentaram-se resistentes. Uma das estirpes do grupo B cresceu na presença de 32 mg/L desse antisséptico. No tocante ao mercúrio, embora a CIM₉₀ dos isolados dos grupos A (Amálgama) e B (Antimicrobianos) tenha sido três vezes mais alta do que a observada para o grupo controle, todas as estirpes mostraram resistência ao cloreto de mercúrio (Tabela 8).

TABELA-8 Susceptibilidade de isolados de staphylococci à clorexidina e cloreto de mercúrio, pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM- mg/L).

Grupo	N*	Clorexidina			Cloreto de Mercúrio		
		variação	50%	90%	variação	50%	90%
A (amálgama)	12	0,5-4	4	4	1-64	2	64
B (antimicrobianos)	13	0,5-32	4	8	2-64	16	64
C (clorexidina)	4	1-4	4	4	1-32	4	32
D (controle)	11	1-16	4	8	1-32	4	16

* Número de isolados

Todos os isolados de *S. mutans* do grupo A (8) e C (6), e sobretudo os do B ($MIC_{90} > 512$ mg/L) foram resistentes à ampicilina, considerando-se que a CIM para amostras de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 é igual a 1 mg/L (GAVAN & BARRY, 1980) diferentemente do grupo D (Controle). Esses dados, bem como aos relativos à clorexidina, estão na Tabela 9. Considerando-se que as CIM_s para esse microrganismo, descrita na literatura (EMILSON, 1981; TSUCHIYA *et al.*, 1994) oscilam entre 0,78 e 6,25 mg/L de clorexidina, a exemplo dos staphylococci, a maioria das estirpes pode ser considerada susceptível, excetuando-se as do grupo B que apresentaram uma CIM_{90} 16 mg/L. No tocante ao mercúrio, a CIM_{90} desses mesmos isolados (grupo B) foi três vezes superior àquela verificada para o grupo controle. No entanto as do grupo A (Amálgama) foram as mais susceptíveis ($CIM_{90} = 1$ mg/L).

TABELA-9 Susceptibilidade de isolados de *Streptococcus mutans* à ampicilina, clorexidina e cloreto de mercúrio, pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM- mg/L).

Grupos	N*	Ampicilina			Clorexidina			Cloreto de mercúrio		
		variação	50%	90%	variação	50%	90%	variação	50%	90%
A (amálgama)	8	0,03-128	0,06	64	0,03-32	1	8	0,03-1	0,125	1
B (antimicrobianos)	10	0,03->512	32	>512	0,03-32	8	16	0,03-16	1	8
C (clorexidina)	6	0,03-16	8	16	0,03-8	2	8	0,03-4	2	4
D (controle)	7	0,03-0,25	0,25	0,25	0,03-4	2	4	0,03-2	1	2

* Número de isolados

A susceptibilidade de 26 isolados de *Lactobacillus* spp., à penicilina-G, clorexidina e cloreto de mercúrio, é apresentada na Tabela 10. Todos, independente do grupo, foram susceptíveis ao antibiótico, com CIM_s abaixo de 32 mg/L (UZEDA, M., c. p.) bem como ao antisséptico (CLEGHORN & BOWDEN, 1977). Em relação ao cloreto de mercúrio, tomando-se por base outra bactéria Gram-positiva como referência, o *S. aureus*, para o qual CIM acima de 1,25 mg/L revela resistência (POSTON & LI SAW HEE, 1991) os isolados dos grupos B e C, ao contrário daqueles dos grupos A (Amálgama) e D (Controle) comportaram-se como resistentes.

TABELA- 10 Susceptibilidade de 27 isolados de *Lactobacillus* spp. à penicilina G, clorexidina e cloreto de mercúrio, pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM-mg/L).

Grupos	Nº *	Penicilina-G			Clorexidina			Cloreto de mercúrio		
		variação	50%	90%	variação	50%	90%	variação	50%	90%
A (amálgama)	6	0,03-0,5	0,06	0,5	0,5-4	2	2	0,5-1	0,5	1
B (antimicrobianos)	14	0,03-8	0,5	0,5	0,03-4	1	4	0,125-4	0,25	4
C (clorexidina)	4	0,03-16	8	16	0,03-4	2	4	0,03-4	2	4
D (controle)	3	0,03-0,06	0,06	0,06	0,5-1	0,5	1	0,03-0,06	0,06	0,06

* Números de isolados

A relação dos resultados obtidos pela técnica de concentração inibitória mínima e o teste E na avaliação da resistência *in vitro* dos isolados de Enterobacteriaceae, *S. aureus*, *S. mutans* e *Lactobacillus* spp., está na Tabela 11. No total, apenas um isolado de *S. aureus* diferiu contra a interpretação susceptível (Teste de diluição) / resistente (Teste E) à oxacilina. Considerando-se as CIM_s obtidas pelas duas técnicas. A concordância mais alta, em termos de concentrações, foi observada para os representantes da família Enterobacteriaceae com cerca de 90%, seguindo-se o *S. aureus* (85%) sendo mais baixa para as estirpes de *S. mutans* (63,64%) e *Lactobacillus* spp. (70,37%).

TABELA- 11 Relação entre as técnicas de concentração inibitória mínima e o teste E na avaliação de isolados de Enterobacteriaceae, *S. aureus*, *S. mutans* e *Lactobacillus* spp.

Microrganismos	Nº*	Concordantes		Discordantes	
		Nº	%	Nº	%
<i>Enterobacteriaceae</i>	19	17	89,47	2	10,52
<i>S. aureus</i>	20	17	85,00	3	15,00
<i>S. mutans</i>	11	17	63,64	4	36,36
<i>Lactobacillus</i> spp.	27	19	70,37	8	29,63

* Número de isolados

O experimento para transferência de resistência aos antimicrobianos, foi realizado por duas técnicas, utilizando isolados de *E. coli* (oito) como doadoras, todas resistentes à cefalotina e cinco à gentamicina, oriundas dos grupos A (uma), B (seis) e D (uma). Houve sucesso na transferência em 50% (4/8) dos isolados, por meio da técnica de cultivo em caldo, com os transconjugantes mostrando resistência à cefalotina (três) e gentamicina (dois). A ocorrência de resistência simultaneamente foi observado em apenas uma estirpe (B 2-2) (tabela 12).

TABELA- 12 Fenotipos das amostras de *E. coli* doadoras e receptora (K-12) utilizadas nos experimentos de transferência de resistência à cefalotina e/ou gentamicina, pela técnica de cultivo em caldo.

Amostra doadora Grupo, paciente, coleta	Amostra doadora Fenotipo	Fenotipo da amostra receptora	Fenotipo do transconjugante esperado	Fenotipo observado
D 3-2	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	-----
A 8-2	CF ^R Lac ⁺	CF ^S Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻	- -----
B 2-1	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻ Sucesso
B 2-2	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	GN ^R Lac ⁻ Sucesso
B 2-4	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻ Sucesso
B 3-3	CF ^R Lac ⁺	CF ^S Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻	-----
B 3-4	CF ^R Lac ⁻ AN ^S	CF ^S Lac ⁻ AN ^R	CF ^R Lac ⁻ AN ^R	-----
B 4-1	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻ Sucesso

* CF= Cefalotina, GN= Gentamicina, AN= Ácido Nalidíxico e Lac= Lactose

Esses resultados foram confirmados pela utilização de membrana Millipore conforme apresentado na Tabela 13. Excetuando-se a amostra B 3-4, os experimentos de conjugação com os isolados que forneceram resultados negativos pela técnica de cultivo em caldo, quando foi utilizada essa técnica, forneceram transconjugantes resistentes.

TABELA- 13, Fenotipos das amostras de *E. coli* doadoras e receptoras (K-12) utilizadas nos experimentos de transferência de resistência à cefalotina e/ou gentamicina, utilizando Millipore.

Amostra doadora Grupo, Paciente e Coleta	Amostra doadora Fenotipo	Amostra receptora Fenotipo	Fenotipo esperado do transconjugante	Fenotipo observado
D 3-2	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	GN ^R Lac ⁻ Sucesso
A 8-2	CF ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻ Sucesso
B 2-1	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻ Sucesso
B 2-2	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	GN ^R Lac ⁻ Sucesso
B 2-4	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	GN ^R Lac ⁻ Sucesso
B 3-3	CF ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻ Sucesso
B 3-4	CF ^R Lac ⁻ AN ^S	CF ^S GN ^S Lac ⁻ AN ^R	CF ^R Lac ⁻ AN ^R	-----
B 4-1	CF ^R GN ^R Lac ⁺	CF ^S GN ^S Lac ⁻	CF ^R GN ^R Lac ⁻	CF ^R Lac ⁻ Sucesso

CF-cefalotina, GN-gentamicina, AN-ácido nalidixico e Lac- lactose

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesta investigação confirmam os dados da relação entre o uso de antimicrobianos como fator de risco para colonização e sobretudo a emergência de microrganismos resistentes. Os voluntários do grupo em uso destes medicamentos (grupo B) apresentaram frequências de colonização por Enterobacteriaceae e *S. aureus* na microbiota bucal de 50% contra 40% e 30%, respectivamente, no grupo controle (D). Os isolados destes microrganismos quando obtidos do grupo B foram mais resistentes do que dos demais grupos; assim enquanto as CIM_s para gentamicina em Enterobacteriaceae e oxacilina para *S. aureus* evidenciaram resistência, com 64 mg/L para gentamicina e >512 mg/L para oxacilina, as do grupo controle foram de 4 mg/L e 0,25 mg/L respectivamente. No tocante aos voluntários em uso de clorexidina e aqueles com múltiplas restaurações em amálgama (grupo A) verificou-se uma redução em todos os microrganismos pesquisados no grupo C, e uma relação entre os estafilococos e resistência ao mercúrio no grupo A.

Fatores que alteram a composição das diversas microbiotas do homem incluem os antibióticos, *status* imune e vários outros fatores intrínsecos e extrínsecos (GREENE, 1996). A administração de novo antimicrobiano está entre as causas que mais interferem, facilitando a colonização por microrganismos epidemiologicamente importantes, constituindo um fator de risco subsequente de infecção no ambiente hospitalar (NORD *et al.*, 1984; BARZA *et al.*, 1987). Em hospitais americanos, aproximadamente um terço dos pacientes utilizam estes medicamentos (SANDE & MANDEL, 1987). Enquanto que no Brasil mais de 40% dos pacientes internados nos hospitais gerais utilizam antimicrobianos

(HUTZLER *et al.*, 1987). No Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia a taxa de prevalência de uso é ainda maior (NOGUEIRA & GONTIJO FILHO, 1994).

A colonização do orofaringe por bacilos Gram-negativos em pacientes idosos (≥ 65 anos) hospitalizados é de 60%, com predomínio de *Klebsiella* 41% seguindo-se *E. coli* 24% e *Enterobacter* spp. 14% (CARVALHO *et al.*, 1992; COHEN, 1992; SILVA *et al.*, 1994). A colonização (50%) encontrada nesta investigação em voluntários hospitalizados, em uso de antimicrobianos, é semelhante àquela descrita por RABELO & GONTIJO FILHO (1996) em crianças hospitalizadas na mesma instituição, Teve um predomínio de *E. coli* (6/11) seguido por *Enterobacter* spp. (4/11). A frequência de bastonetes Gram-negativos no grupo D (40%) pode ser considerada alta embora, apenas cerca de 50% dos isolados tenham sido caracterizados como *E. coli* e tribo *Klebsiellae*.

Outros fatores que contribuem para aderência de bactérias Gram-negativas nas células bucais, bem como daquelas da mucosa das vias aéreas inferiores, incluem a uremia e a subnutrição (NIEDERMAN *et al.*, 1984). Esta colonização é considerada um dos principais fatores responsáveis pelas pneumonias hospitalares causadas por esses microrganismos (CARVALHO *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1994).

Entre os microrganismos mais importantes como agentes de infecções hospitalares a partir dos anos 80, estão os *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e o *Staphylococcus* spp. coagulase negativa (WENZEL, 1985; NEU, 1992). Os principais fatores de risco de colonização e infecção por MRSA incluem gravidade da doença, presença de catéteres, permanência prolongada no hospital e tratamento com antimicrobianos (BOYCE, 1992). As narinas, períneo, intestino e cavidade bucal estão entre os sítios anatômicos onde eles são mais

frequentemente encontrados (BOYCE, 1992). RABELO & GONTIJO FILHO (1996) encontraram na cavidade oral de crianças internadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, uma taxa de colonização por *S. aureus* de 55%, com predomínio de MRSA. Nessa série, trabalhando com adultos internados no mesmo hospital, foi também observada uma alta (50%) prevalência de MRSA nesse sítio, que mostrou uma relação direta com o tempo de uso de antimicrobianos. A presença de *S. aureus* nos voluntários dos grupos A e D (controle) foi de respectivamente, 20 e 30%, compatível com o descrito na literatura (MURRAY *et al.*, 1992; MILLINS *et al.*, 1994).

A cárie dentária é uma doença infecciosa causada por bactérias cariogênicas, com destaque para o grupo *Streptococcus mutans* (LOESCHE, 1986; LOESCHE, 1993; TSUCHIYA *et al.*, 1994; JORGE, 1995). Indivíduos com altos níveis de *S. mutans* apresentam alto risco de cárie dentária (EMILSON & KRASSE, 1985; LOESCHE, 1986). Estratégias de prevenção de cáries incluem: eliminação dessas bactérias da cavidade bucal, inibição da formação da placa bacteriana e incremento da resistência dos dentes à desmineralização (TSUCHIYA *et al.*, 1994; EMILSON, 1994). No presente estudo excetuando-se o grupo em uso de clorexidina (C) os demais não apresentaram diferenças quantitativas quanto a esses microrganismos.

Outro grupo de microrganismos importante na etiologia da cárie dentária é o do *Lactobacillus* spp. que participa da progressão da mesma em virtude de suas características acidúrica e acidogênica (LOESCHE, 1993). A presença de *Lactobacillus* spp. foi mais observada nos grupos de voluntários mais velhos e com os dentes em piores condições (grupos A e B).

Entre os diversos produtos para higiene bucal e prevenção da cárie dentária destaca-se o uso da clorexidina (SENIOR, 1973; LOESCHE, 1993;

JORGE, 1995). Ele foi testado em vários estudos, em paralelo com outros produtos, mostrando uma redução nas contagens microbianas da saliva de cerca de 90% e com uma maior atividade antiplaca (LÖE, 1971; EMILSON, 1994). Essas observações foram feitas neste estudo, com uma diminuição, por ordem decrescente, de Enterobacteriaceae, *S. aureus*, *S. mutans* e *Lactobacillus* spp. nos voluntários em uso deste antisséptico. Um dos principais problemas da utilização por tempo prolongado, é a sua interferência no paladar (LÖE *et al.*, 1972; GARDNER & GRAY, 1983) fato verificado nesta série, justificando a não consideração das coletas realizadas na quarta semana no grupo C, pela informação, por muitos voluntários, da suspensão do uso.

A clorexidina, tem um efeito antimicrobiano residual, ou seja, várias horas após sua aplicação na forma de bochechos, a saliva conserva uma capacidade inibitória sobre os microrganismos (HEARD & ASHWORTH, 1968; LOESCHE, 1993). Esta questão foi contornada, nos experimentos realizados, pela adição de lecitina e *tween* 80 na salina utilizada, no transporte dos espécimes coletados com *swab*.

O amálgama dentário é com certeza o material restaurador mais usado ao longo de muitas décadas, é uma mistura que libera mercúrio no estado de vapor na fórmula Hg^0 , que é absorvido principalmente por inalação e, em menor porcentagem, pela absorção gastrointestinal (WHO, 1991). A sua interferência com a microbiota da cavidade bucal não tem merecido atenção, exceto, o desenvolvimento de resistência de microrganismos ao mercúrio, associada a de antimicrobianos que tem sido notada (RICHMOND & JOHN, 1964; MILLAR *et al.*, 1987). Alguns autores mostram a relação de restaurações à amálgama e aumento do nível de mercúrio no sangue e urina (SNAPP *et al.*, 1989; MOLIN *et al.*, 1990).

O problema da resistência antimicrobiana é universal. Inicialmente ela pode emergir em resposta a fatores locais, com destaque para o uso de alguns antibióticos em particular, mas uma vez presente em uma área geográfica frequentemente, aparece em outras rapidamente, em parte devido à facilidade com que as bactérias trocam informações genéticas responsáveis pela resistência, as falhas técnicas, resultando na transmissão de microrganismos de um paciente para outro e, provavelmente, a disseminação de bactérias dentro de uma comunidade e outras comunidades, pela precariedade na higiene e saneamento básico (JACAB & ARCHER, 1991; NEU, 1992). No ambiente hospitalar, os patógenos considerados problema, atualmente, incluem bastonetes Gram-negativos multirresistentes, MRSA e *Enterococcus* resistente à vancomicina (FLAHERTY & WEINSTEIN, 1996). As bactérias hospitalares, geralmente, são mais resistentes do que as isoladas de pacientes na comunidade, e aquelas de hospitais de assistência terciária, mais do que aquelas de hospitais comunitários (ELLNER *et al.*, 1987). Nessa série, em relação às bactérias Gram-negativas, as prevalências de isolados multirresistentes foram as mesmas nos grupos B e D. Todos os isolados foram resistentes à ampicilina e, aproximadamente, 50% à tetraciclina, refletindo a ampla utilização destes antimicrobianos em nosso país. Ao contrário do grupo controle, foi isolado um estirpe de *E. coli* de um voluntário do grupo A, resistente aos β -lactâmicos testados. Ao contrário, isolados de MRSA, todos multirresistentes, somente foram encontrados no grupo em uso de antimicrobianos, a exemplo com o ocorrido com os *Staphylococcus* spp. em relação à oxacilina. O tempo de hospitalização, o tratamento prévio com antibiótico e a proximidade de um paciente colonizado ou infectado com MRSA, predispõe infecção pelo mesmo. Os voluntários do grupo B preenchem duas dessas condições.

Entre os dois microrganismos de importância na etiologia da cárie dentária, somente os isolados de *S. mutans* foram testados pela técnica de difusão em gel neste trabalho, por não haver critérios de interpretação, em mãos, dos halos de inibição, para os *Lactobacillus* spp. Esse *Streptococcus* e os demais do grupo viridans são altamente susceptíveis à penicilina e ampicilina (SHLAES, 1992; LOESCHE, 1993). Outros agentes ativos *in vitro* incluem a vancomicina, eritromocina e clindamicina (SHLAES, 1992). No entanto, a frequência de resistência à ampicilina nos isolados dessa série, notadamente de voluntários do grupo B (7/10) foi alta, o mesmo ocorrendo com relação à eritromicina (6/10).

Os aminoglicosídeos tem desempenhado um papel vital no tratamento de infecções por Enterobacteriaceae e outras bactérias Gram-negativas. Entre estes antimicrobianos, a gentamicina é um dos mais populares, mas é susceptível, principalmente, à inativação por algumas enzimas produzidas por bactérias resistentes (NEU, 1992). As CIM_s (mg/L) para interpretação de uma *E. coli* como susceptível ou resistente, é de ≤ 4 e ≥ 16 , respectivamente (COLLINS *et al.*, 1995; WOODS & WASHINGTON, 1995). Assim, os isolados de pacientes do grupo em uso de antimicrobianos apresentaram uma CIM₉₀, evidenciando resistência ao contrário daqueles provenientes do grupo controle. Os resultados foram compatíveis com os da técnica de difusão em gel, quando 7/11 dos isolados do grupo B comportaram-se como susceptíveis, pois a CIM₅₀ foi para as estirpes deste grupo, de 1 mg/L.

Como foi referido na introdução, o MRSA e *Staphylococcus* spp., com predomínio do *S. epidermidis*, estão entre os principais agentes de infecções hospitalares nos dias atuais (BOYCE, 1992; GRAY & PEDLER, 1992; HERWALDT & WENZEL, 1995). Estes microrganismos são considerados resistentes, pela técnica de diluição em agar, quando a CIM for superior a 4 mg/L

(COLLINS *et al.*, 1995; HERWALDT & WENZEL, 1995). Verificou-se uma diferença marcante nas CIM_s, dos isolados desses microrganismos no grupo B (>512 mg/L) em comparação com os demais.

Os *S. mutans* são susceptíveis às penicilinas e demais β -lactâmicos (MURRAY *et al.*, 1992; LOESCHE, 1993). As CIM_s relativas à susceptibilidade é de 0,12 mg/L para a penicilina-G e para a ampicilina, frente aos Estreptococos outros, que não o *S. pneumoniae*. Nessa série foi observada uma variação muito ampla nas CIM_s para as 31 estirpes testadas. Considerando-se as CIM_{s50}, os isolados do grupo B foram caracterizados como resistentes à ampicilina.

Os bacilos Gram-positivos não formadores de esporos (*Eubacterium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* e *Lactobacillus* spp.) são tipicamente susceptíveis à penicilina, embora, os *Lactobacillus* possam ser resistentes às cefalosporinas (WEXLER & DOERN, 1995). Isto foi observado nessa série, com todos os isolados deste microrganismo, apresentando CIM_s baixas, excetuando-se quatro provenientes do grupo C (16 mg/L) mas, também, susceptíveis.

O digluconato de clorexidina é um dos antissépticos tradicionais, em função da sua baixa toxicidade e boa atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AINAMO, 1977; GARDNER & GRAY, 1983; BAILLIE, 1989; MILLINS *et al.*, 1994). Não há até o momento evidências do papel de plasmídeos associados à resistência dessas bactérias (RUSSELL *et al.*, 1986). Entretanto, usualmente, como foi referido na introdução, o termo resistência em relação aos antissépticos é usado para justificar uma amostra que não é susceptível ao mesmo, quando utilizado na prática (STICKLER & THOMAS, 1982). Por outro lado, alguns autores tem sugerido que o uso em grande escala de detergentes catiônicos, bem como da clorexidina, pode resultar em espécies resistentes a este antisséptico e aos antimicrobianos (STICKLER & THOMAS,

1980; BRUMFITT *et al.*, 1985; PEARMAN *et al.*, 1985; RUSSELL *et al.*, 1986; BAILLIE, 1987). As CIM_s de clorexidina para Enterobacteriaceae, estafilococos, *S. mutans* e *Lactobacillus* spp. são, respectivamente, 50 mg/L, 10 mg/L (GARDNER & GRAY, 1983; FRENEY *et al.*, 1988) 6 mg/L e 3 mg/L (TSUCHIYA, *et al.*, 1994). Nesta série, os isolados identificados como da família Enterobacteriaceae comportaram-se como resistentes (CIM₉₀ de 128 mg/L) enquanto os de staphylococci e *Lactobacillus* spp. foram susceptíveis. Em relação aos *S. mutans*, aqueles provenientes de voluntários em uso de antimicrobianos, comportaram-se como resistentes (16 mg/L) ao contrário dos demais, incluindo os seis isolados do grupo C (em uso de clorexidina).

A resistência ao mercúrio associada ou não aos antimicrobianos, notadamente à oxacilina/meticilina, mediada principalmente por genes plasmidiais, portanto, passível de ser transferida, está bem documentada em *S. aureus* e *S. epidermidis* (RUSSELL, 1985; POSTON & LI SAW HEE 1991; NEU, 1992).

Considerando a CIM de 5 mg/L, todas as estirpes de staphylococci investigadas foram resistentes, embora as CIM₅₀ para as do grupo B tenham sido três vezes mais altas do que as do grupo controle. Considerando que a CIM \geq 8 mg/L indica resistência para *Pseudomonas aeruginosa* e que esta bactéria é mais resistente aos mercúriaes orgânicos e outros antissépticos do que as Enterobacteriaceae (MARTINS *et al.*, 1991) os isolados de Gram-negativos nessa série (grupos B e D) foram resistentes ao mercúrio.

Na ausência de dados da susceptibilidade/resistência ao mercúrio, dos microrganismos relacionados à cárie dentária e considerando-se aqueles referidos para staphylococci como parâmetro, *S. mutans* e *Lactobacillus* spp. encontrados

nessa investigação não foram resistentes (CIM <5 mg/L) excetuando-se dois isolados de *S. mutans* no grupo em uso de antimicrobianos.

Os métodos de testar susceptibilidade de antimicrobianos para determinação da concentração inibitória mínima, são preferidos nos Estados Unidos da América e em outros países desenvolvidos, em virtude de sua automatização. Esta, vem ocorrendo de forma muito mais lenta em países como o Brasil em função dos custos, assim o teste de difusão em gel tem sido o mais popular nos laboratórios de patologia clínica. Recentemente, foi introduzido um método *in vitro* para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana quantitativamente, com leitura direta. Este teste combina a simplicidade e a flexibilidade do teste de difusão em disco com a possibilidade de determinar as CIM_s de um agente antimicrobiano, em particular para um isolado microbiano, onde são verificados altos níveis de concordância entre o teste E e métodos clássicos de diluição, na detecção de MRSA e Enterobacteriaceae (BOLMSTROM *et al.*, 1988; HUANG *et al.*, 1992; SANTOS FILHO, 1995). Tal concordância foi verificada nessa série, quando apenas uma estirpe de *S. aureus*, isolada de voluntário do grupo controle, foi susceptível pela técnica de difusão e resistente pela do teste E.

A forma mais frequente de resistência de bactérias aos antimicrobianos ocorre pela transferência de plasmídeos pela conjugação, particularmente comum entre Enterobacteriaceae *Pseudomonas* e bactérias anaeróbias (NEU, 1992). A propagação dessa resistência pode ocorrer dentro de gêneros, bem como entre as Enterobacteriaceae *Pseudomonas* e *Bacteroides* (COHEN, 1992; NEU, 1992; MUHAMMAD *et al.*, 1993; THA, 1993).

A disseminação de resistência aos antimicrobianos, pode ser detectada por meio de diversas técnicas, destacando-se o subcultivo prévio das estirpes doadoras e receptoras e a mistura subsequente em caldo ou sobre a membrana Millipore (FORBES & SCHABERG, 1983; MUHAMMAD *et al.*, 1993;

LEGAKIS *et al.*, 1995). Os experimentos de investigação realizados por estas duas técnicas, utilizando os oito isolados de lactose positiva de Enterobacteriaceae apresentaram sucesso na transferência em quatro e sete, respectivamente. Entre os clones transconjugantes obtidos, apenas dois corresponderam integralmente ao fenotipo de resistência verificado na estirpe doadora, com resistência simultânea aos dois antimicrobianos; os demais, apresentaram-se resistentes à cefalotina (cinco) ou à gentamicina (quatro). A análise de plasmídeos dos isolados doadores e da *E. coli* K 12 não foi realizada.

6. CONCLUSÕES

Conclui-se com esse trabalho que o uso de antimicrobianos é um fator de risco para colonização por microrganismos epidemiologicamente importantes (Enterobacteriaceae e MRSA) multirresistentes, bem como, de *Streptococcus mutans* resistentes à ampicilina, na cavidade bucal. Entretanto, não foi detectada a emergência de microrganismos resistentes à clorexidina, durante o período de três semanas. No tocante ao mercúrio e a presença de múltiplas restaurações à amálgama, não foi constatada relação de resistência em nenhum dos microrganismos, mas os isolados de estafilococos, foram mais resistentes a esse íon no grupo em uso de antimicrobianos do que nos demais grupos.

7. SUMMARY

The objective of this investigation was to realize a case-control study of the impact about the use of antimicrobials, chlorhexidine and mercury on resistance of microorganisms of medical and dentistry interests (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp.) stading on oral cavity. Four groups were tested, each one with ten voluntaries, included: A- with many amalgam fillings, B- in use of antimicrobial agents, C- in use of chlorhexidine digluconate in daily mouthwashes and D- without any report of dental caries, as control. The microbiological admonition was realized in the process of four weeks. The resistance was determined *in vitro* by techniques of gel diffusion for antimicrobials an by agar dilution method for antimicrobials, chlorhexidine digluconate and mercury chloride. The experiments of resistance transference were realized by techniques of broth culture and membrane filtration, using *E. coli* K12 as a reciever.

An important colonization by Enterobacteriaceae was detected in the B group (50%) and control (40%). The most frequent isolated species in the B group was *E. coli* (6/11). One-third of these microorganisms were multiresistants, but they were, in the majority, from B group . The MIC for gentamycin in this group, were of 64 mg/L, against 4 mg/L in the control group. These microorganismis strains were resistant to chlorhexidine and mercury, independent of the group.

Staphylococcus aureus colonization was 50% in B group and the observed in D group was 30%, with an increasing colonization during antimicrobial use. The staphylococci microorganisms showed resistance to oxacillin (MIC₉₀ >512

mg/L) in the B group. These microorganisms, were susceptible to chlorhexidine and resistant to mercury, but with MIC_s three times more increased than those of the fillings volunteers, or in use of antimicrobials, in relation to mercury.

The volunteers group with regular use of chlorhexidine, *Streptococcus mutans* was the most affected microorganisms. The simultaneous resistance to several antimicrobials, particularly to ampicillin, was the most common in the B group (8/10) with MIC₉₀ >512 mg/L. These strains isolated of this species were susceptible to chlorhexidine and mercury, except two from B group.

Lactobacillus spp. strains studied were susceptible to penicillin-G, chlorhexidine and mercury.

The MIC calculated by the E test for gentamicin (Enterobacteriaceae), oxacillin (staphylococci), ampicillin (*Streptococcus mutans*), and penicillin-G (*Lactobacillus* spp.) is in agreement with the classical technique except an strain of MRSA that was susceptible with this technique.

Conjugation experiments with lactose positive strains of Enterobacteriaceae succeed in seven of eighth experiments; however, only two transcojugants revealed two resistance marks.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01- AINAMO, J. (1977). Control of plaque by chemical agents. *J. Clin. Periodontol.* 4: 23.
- 02- BAILLIE, L. W. J. (1989). Magnesium and Chlorhexidine MIC determination. *J. Hosp. Infect.* 14: 264-266.
- 03- BAKER, J. P., EVANS, R. T., SLOTS, J. & GENCO, R. J. (1985). Susceptibility of human oral anaerobic bacteria to antibiotics suitable for topical use. *J. Clin. Periodontol.* 12: 201-208.
- 04- BARZA, M., GIULIANO, M., JACOBUS, N. V. & GORBACH, S. L. (1987). Effect of broad- spectrum parenteral antibiotics on "colonization resistance" of intestinal microflora of humans. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31: 723-727.
- 05- BERKELMAN, R. L., ANDERSON, R. L., DAVIS, B. J., HIGHSMITH, A. K., PETERSEN, N. J., BOND, W. W., COOK, E. H., MACKEL, D. C., FAVERO, M. S. & MARTONE, W. J. (1984). Intrinsic bacterial contamination of a commercial iodophor solution: investigation of the implicated manufacturing plant. *Appl. & Environ. Microbiol.* 47: 752-756.
- 06- BLOCK, S. S. (1983). Desinfection, Sterilization and Preservation. Philadelphia, *Lea & Febiger*, 1049 p.
- 07- BOLMSTROM, A., ARVDSON, S., ERICSSON, M. & KARISSON, A. (1988). A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms. In: *Interscience Conference on Antimicrob. Agents Chemother.* Los Angeles.
- 08- BOYCE, J. M. (1992). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitals and long-term care facilities: Microbiology, Epidemiology, and Preventive measures. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 13: 725-737.

- 09- BRUMFITT, W., HAMILTON-MILLER, J. M. & DIXSON, S. (1985). Resistance to antiseptics in methicillin and gentamicin resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 1: 1442-1443.
- 10- BRUMFITT, W. & HAMILTON-MILLER, J.M. (1989). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 320: 1188-1196.
- 11- BRYAN, L. E. (1988). Alteration of the antibiotic target site *J. Antimicrob. Chemother.* 22, (suppl. A).
- 12- CARVALHO, A. M. C., SANTOS, A. & GONTIJO FILHO, P. P. (1992). Relação entre as taxas de infecção, Flora Hospitalar e Uso de Antimicrobianos em duas Unidades de Pediatria. in: *Congresso Brasileiro de Infectologia, IV*, São Paulo, Brasil, Resumos p. 75.
- 13- CHOPRA, I. (1982). Microbiol resistance to non-antibiotic antimicrobial agents: plasmids and bacterial resistance, p. 199-206. In: Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Oxford, *Blackwell Scientific Publication*. RUSSEL, A. D.; HUGO, W, B. & AYLIFFE, G. A. J. (eds.).
- 14- CLEGHORN, B. & BOWDEN, G. H. (1977). The effect of pH on the sensitivity of species of *Lactobacillus* to chlorhexidine and the antibiotics minocycline and spiramycin. *J. Dent. Res.* 68: 1146-1150.
- 15- COHEN, M. L. (1992). Epidemiology of Drug Resistance: Implication for a Post-Antimicrobial Era. *Science* 257: 1050-1055.
- 16- COLLINS, C. H., LYNE, P. M. & GRANGE, J. M. (1995). Microbiological Methods, 7 ed., Oxford, Great Britain, *Butterworth- Heinemann*, 493 p.
- 17- EICKHOFF, T. C. (1979). Antibiotics and nosocomial infections. In: Hospital Infections. Boston. Mass. *Little, Brown & Co.* BENNETT, J. V. & BRACHMAN, P. S. (eds.): 195-221
- 18- ELLNER, P. D., FINK, D. J., NEU H. C. & PARRY, M. F. (1987). Epidemiologic factors affecting antimicrobial resistance of common bacterial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1668-1674.

- 19- EMILSON, C. G. (1981). Effect of chlorhexidine gel treatment on *Streptococcus mutans* in human saliva and dental plaque. *Scand. J. Dent.* 89: 239-246.
- 20- EMILSON, C. G. (1994). Potential efficacy of chlorhexidine against Mutans Streptococci and human dental caries. *J. Dent. Res.* 73: 682-691.
- 21- EMILSON, C. G. & KRASSE, B. (1985). Support for and implications of the specific plaque hypothesis. *Scand. J. Dent.* 93: 96-104.
- 22- EMORI, T. G. & GAYES, R. P. (1993). An Overview of Nosocomial Infections Including the Role of the Microbiology Laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 428- 442.
- 23- FARMER III, J. J. & KELLY, M. T. (1991). *Enterobacteriaceae*. In: Manual of Clinical Microbiology. 5 ed., Washington. American Society for Microbiology. DC, BALLOWS, A., HAUSLER Jr., W. J., HERMANN, K. L., ISENBERG, H. D. & SHADOMY, H. J. (eds.): 360-395.
- 24- FLAHERTY, J. P. & WEINSTEIN, R. A. (1996). Nosocomial infection caused by antibiotic-resistant organisms in the intensive-care unit. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 17: 236-248.
- 25- FORBES, B. A. & SCHABERG, D. R. (1983). Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. *J. Bacteriol.* 153: 627-634.
- 26- FRENEY, J., HUSSON, M. O., GAVINI, F., MADIÉ, S., MARTRA, A., IZARD, D., LECLERC, H. & FLEURETTE, J. (1988). Susceptibilities to antibiotics and antiseptics of new species of the family Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32: 873- 876.
- 27- GARDNER, J. F. & GRAY, K. G. (1983). Chlorhexidine, p 251-270. In: Desinfection, sterilization and preservation, 3 ed. Lea & Febiger, Philadelphia. S. S. BLOCK (ed.).

- 28- GAVAN, T. L. & BARRY, L. (1980). Microdilution Test Procedures. *In: Manual of Clinical Microbiology*. 3 ed. Washington D C. *American Society for Microbiology*. LENNETTE, E. H., BALOWS, A., HAUSLER Jr., W. J. & TRUANT, T. P. (eds).
- 29- GOLD, O. C., JORDAN, H. V. & van HOUTE, J. (1973). A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.* 18: 1357-1364.
- 30- GRAY, W. J. & PEDLER, S. J. (1992). Antibiotic-resistant enterococci. *J. Hosp. Infect.* 21: 1-14.
- 31- GREENE, J. N. (1996). The microbiology of colonization, including techniques for assessing and measuring colonization. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 17: 114-118.
- 32- HEARD, D. D. & ASHWORTH, R. W. (1968). The colloidal properties of chlorhexidine and its interaction with some macromolecules. *J. Pharm. Pharmacol.*, 20: 505.
- 33- HERWALDT, L. A. & WENZEL, R. P. (1995). Dynamics of Hospital-Acquired Infection. *In: Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed., Washington DC. *American Society for Microbiology*. MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C. & YOLKEN, R. H. (eds.): 169-181.
- 34- HUANG, L. P., BAKER, P. N., BANERJEE, S. & TENOVER, F. C. (1992). Accuracy of the E test for determining antimicrobial susceptibilities of staphylococci, enterococci, *Campylobacter jejunii* and Gram-negative bacteria resistant to antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.* 30: 3243-3248.
- 35- HUTZLER, R. V., BAZONE, J. R. C., ULSON, C. M., RODRIGUES, E. & COSCINA, A. L. (1987). Infecções hospitalares. *In: Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro. *Guanabara Koogan*. VERONESI, R. (ed.): 561-572.
- 36- JACOBY, G. A. & ARCHER, G. L. (1991). New mechanism for bacterial resistance to antimicrobial agents. *N. Engl. J. Med.* 324: 601-612.

- 37- JOHANSON Jr., W. G., PIERCE, A. K. & SANFORD, J. P. (1969). Changing pharyngeal bacterial flora of hospitalized patients: emergence of gram negative bacilli. *N. Engl. J. Med.* 281: 1137-1142.
- 38- JORGE, A. O. C. (1995). *Microbiologia Bucal*. São Paulo, Brasil, Editora Santos, 121 p.
- 39- KLOOS, W. E. & LAMB Jr., D. W. (1991). *Staphylococcus*. In: Manual of Clinical Microbiology. 5 ed., Washington DC. American Society for Microbiology. BALLOWS, A., HAUSLER Jr., W. J., HERMAN, K. L., ISENBERG, H. D. & SHADOMY, H. J. (eds).
- 40- KUNIN, C. M., JOHANSEN, K. S., WORNING, A. M. & DASCHENER, F. D. (1990). Report of a Symposium on Use and Abuse of Antibiotics Worldwide. *Rev. Infect. Dis.* 12: 12-19.
- 41- KUNIN, C. M. (1993). Resistance to Antimicrobial Drugs - A Worldwide Calamity. *Ann. Intern. Med.* 118: 557-561.
- 42- LEGAKIS, N.J., TZOUVELEKIS, L. S. HATZOUDIS, G., TZELEPI, E., GOURKOU, A., PITT, T. L. & VATOPOULOS, A. C. (1995). *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals. Dissemination of plasmids encoding an SHV-5 type- β lactamase. *J. Hosp. Infect.* 31: 177-187.
- 43- LINTON, K. B., LEE, PATRICIA, A., RICHMOND, M. H., GILLESPIE, W. A., ROWLAND, A. J. & BAKER, VALERIE, N. (1972). Antibiotic resistance and transmissible R-factors in the intestinal coliform flora of healthy adults and children in an urban and a rural community. *J. Hyg. Camb.* 70: 99-104.
- 44- LÖE, H. (1971). Human research model for the production and prevention of gingivitis. *J. Dent. Res.* 50: 256-264.

- 45- LÖE, H., von der FEHR, F. R. & SCHIÖTT, C. R. (1972). Inhibition of experimental caries by plaque prevention. The effect of chlorhexidine mouthrinses. *Scand. J. Dent. Res.* 80: 1-9.
- 46- LOESCHE, W. J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50: 353-380.
- 47- LOESCHE, W. J. (1993). Cárie Dental uma infecção tratável. Rio de Janeiro. Brasil. *Cultura Médica.* 350 p.
- 48- LOWBURY, E. J. L. (1951). Contamination of cetrimide and other fluids with *Pseudomonas pyocyanea*. *Br. J. Indust. Med.* 8: 22-25.
- 49- LOWBURY, E. J. L., LILLY, H. A. & AYLIFFE, G. A. J. (1974). Preoperative disinfection of surgeons' hands: Use of Alcoholic solutions and effects of gloves on skin flora. *Br. Med. J.*, 4: 396.
- 50- MAC FADDIN, J. F. (1980). Biochemical tests for identification of medical bacteria, 2 ed., Baltimore *Williams & Wikins.* p 64-77.
- 51- MANNIELLO, J. M., HAYMAN, H. & ADAIR, F. W. (1979). Isolation of atypical lipopolysaccharides from purified cell walls of *Pseudomonas cepacea*. *J. Gen. Microbiol.* 112: 397-400.
- 52- MARTINS, M. F., SILVA, G. M. & GONTIJO FILHO, P.P. (1991). Relação entre a resistência a antimicrobianos e antissépticos em *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Microbiol.* 22: 34-38.
- 53- MILLAR, M. R., GRIFFIN, N. & KEYWORTH, N. (1987). Pattern of antibiotic and heavy-metal ion resistance in recent hospital isolates of *Staphylococcus aureus*. *Epidemiol. Infect.* 99: 343-347.
- 54- MILLNS, B., MARTIN, M. V. & FIELD, E. A. (1994). The sensitivity to chlorhexidine and cetyl pyridinium chloride of *Staphylococci* on the hands of dental students and theatre staff exposed to these disinfectants. *J. Hosp. Infect.* 26: 99-104.

- 55- MOLIN, M., BERGMAN, B., MARKLUND, S. L., SCHÜTZ, A. & SKERFVING, S. (1990). Mercury, selenium and glutathion peroxidase before and after amalgama removal in man. *Acta Odontol. Scand.* 48: 189-202.
- 56- MUHAMMAD, G., HOBLET, K. H., JACKWOOD, D. J., BECH-NIELSEN, S. & SMITH, K. L. (1993). Interespecific conjugal transfer of antibiotic resistance among *Staphylococci* isolated from the bovine mammary gland. *Am. J. VET. Res.* 54: 1432-1440.
- 57- MURRAY, P. R., DREW, W. L., KOBAYASHI, G. S. & THOMPSON, J. H. (1992). *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan. p. 513.
- 58- (NCCLS). NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (1983). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Tentative atandard M7-T. Pensilvania. Villanova.
- 59- (NCCLS). NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (1993a) Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved Standard, M2-T4. 4 ed. Pensilvania. Villanova.
- 60- NEU, H. C. (1992). The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science* 257: 1064-1073.
- 61- NIEDERMAN, M. S., MERRIL, W. W. & FERRANTI, R. D. (1984). Nutritional status and bacterial binding in the lower respiratory tract in patients with chronic tracheostomy. *Ann. Intern. Med.* 100: 795-800.
- 62- NOGUEIRA, C. R. & GONTIJO FILHO, P. P. (1994). Prevalência e modelos de uso de antibióticos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia. *Sétima Semana Científica de Medicina da UFU*: 12 p.
- 63- NORD, C. E., KAGER, L. & HEIMDHAL, A. (1984). Impact of antimicrobial agents on the gastrointestinal microflora and the risk of infections. *Am. J. Med.* 76: 99-106.

- 64- PEARMAN, J. W., CHRISTIANSEN, K. J., ANNEAR, D. I., GOODWIN, C. S., METCAFF, C., DONOVAN, F. P., MACEY, K. L., POWELL, I. M., GREEN, J. M., HARPER, W. E. & MC KELVIE, M. S. (1985). Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an Australian metropolitan teaching complex. *Med. J. Australia* 142: 103-108.
- 65- PERES, A. G., SILVA, M. G., DAVID, M. T. S. S. & GONTIJO FILHO, P. P. (1989). Influência do inóculo bacteriano no teste de susceptibilidade às quinolonas pelo método de diluição em agar. *Rev. Microbiol.* 20 (1): 53-55.
- 66- POSTON, S. M. & F-L LI SAW HEE (1991). Genetic characterisation of resistance to metal ions in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: elimination of resistance to cadmium, mercury and tetracycline with loss of methicillin resistance. *J. Med. Microbiol.* 34: 193-201.
- 67- RABELO, L. F. D. & GONTIJO FILHO, P. P. (1996). Prevalência de infecções hospitalares e fatores de risco intrínsecos e extrínsecos em pediatria, em dois hospitais Universitários localizados em Uberlândia e no Rio de Janeiro. *Arq. Bras. Med.* 8: 399-405.
- 68- RICHMOND, M. H. & JOHN, M. (1964). Co-transduction by a staphylococcal phage of the genes responsible for penicillinase synthesis and resistance to mercury salts. *Nature* 202: 1360.
- 69- ROGOSA, M., MITCHEL, J. A. & WISEMAN, R. F. (1951). A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal *Lactobacilli*. *J. Bacteriol.* 62: 132-137.
- 70- RUSSELL, A. D. (1985). The role of plasmids in bacterial resistance to antibiotics, disinfectants and preservatives. *J. Hosp. Infect.* 6: 9-19.
- 71- RUSSELL, A. D., HAMMOND, S. A. & MORGAN, J. R. (1986). Bacterial resistance to antiseptics and disinfectants. *J. Hosp. Infect.* 7: 213-225.

- 72- RUSSELL, A. D., HAMMOND, S. A. & MORGAN, J. R. (1987). Susceptibility comparative for antiseptic and disinfectants of the gram negative bacteria isolation of hospital. *J. Hosp. Infect.* 9: 255-264.
- 73- SALLSTEN, G. THORÉN, J. BARRGARD, L., SCHUTZ, A. & SKARPING, G. (1996). Long-term use of nicotine chewing gum and mercury exposure from dental amalgam fillings. *J. Dent. Res.* 75: 594-598.
- 74- SANDE, M. A. & MANDEL, G. L. (1987). Quimioterapia das doenças microbianas. In: *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. GOODAN, L. S. & GILMAN, A. S. (eds.). 701-717
- 75- SANTOS FILHO, L. (1995). Estudo da diversidade clonal de amostras *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolados em João Pessoa- PB. *Tese Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro 101 p.
- 76- SENIOR, N. (1973). Some observations on the formulation and properties of chlorhexidine. *J. Soc. Cosmetic. Chem.* 24: 259.
- 77- SHLAES, D. M. (1992). Miscellaneous Streptococci.. In: *Infectious Diseases*. Philadelphia. Pennsylvania. Saunders Company. GORBACH, S. L., BARTLETT, J. G. & BLACKLOW, N. R. (eds.). 1425-1428.
- 78- SILVA, P. M. F., DAVID, C. M. N. & GONTIJO FILHO, P. P. (1994). Patogenia e diagnóstico bacteriológico de pneumonias hospitalares em pacientes internados na UTI/HU/UFRJ. *Rev. Bras. Terap. Intens.* 2: 47-50.
- 79- SNAPP, K. R., BOYER, D. B., PETERSON, L. C. & SVARE, C. W. (1989). The contribution of dental amalgam to mercury in blood. *J. Dent. Res.* 68: 780-785.
- 80- STEERS, E., FOLTZ, E. L., GRAVES, R. S. & RIDEN, J. (1959). An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiotics Chemother.* 9: 307-311.

- 81- STICKLER, D. J. & THOMAS, B. (1980). Antiseptic and antibiotic resistance in gram negative causing urinary tract infection. *J. Clin. Pathol.* 33: 288-296.
- 82- STICKLER, D. J. & THOMAS, B. (1982). Intrinsic resistance to non-antibiotic antibacterial agents. *In: Principles and Practice of disinfection, Preservation and Sterilisation* Oxford. Blackwell. *Scientific Publications.* RUSSELL, A. D. *et al.*, (eds.): 186-196.
- 83- STICKLER, D. J., THOMAS, B., CLAYTON, C. L. & CHAWLA, J. C. (1983). Studies on the genetic basis of chlorhexidine resistance. *Brist. J. Clin. Prat., Simposium 25*: 23-28.
- 84- SUTHERLAND, R., BOON, R. J., GRIFFIN, K. E., MASTERS, P. J., SLOONCOMBE, B. & WHITE, A. R. (1985). Antimicrobial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrob. Agents Chemother.* 27: 495-498.
- 85- THA, S. (1993). Mobile genetic elements in antibiotic resistance. *J. Med. Microbiol.* 38: 157-159.
- 86- TSUCHIYA, H., SATO, M., IINUMA, M., YOKOYAMA, J., OHYAMA, M., TANAKA, T., TAKASE, I. & NAMIKAWA, I. (1994). Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plant flavanones. *Birkhauser Verlag Basel*, 846-849.
- 87- VALENTI, W. M., TRUDELL, R. G. & BENTLEY, D. W. (1978). Factors predisposing to oropharyngeal colonization with gram-negative bacilli in the aged. *N. Engl. J. Med.* 298: 1108-1111.
- 88- WENZEL, R. P. (1985). Infection. Control priorities in Critical Care medicine: device associated intravascular infections. *In: Manual Clinical Microbiology.* 4 ed, Washington. *American Society for Microbiology.* LENNET, E. D., BALLOWS, A., HAUSLER JR. W. J. & SHADIMY H. J. (eds.): 123-128.

- 89- WEXLER, H. M. & DOERN, G. V. (1995). Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *In: Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed., Washington DC. *American Society for Microbiology*. MURRAY, R. H., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C. & YOLKEN, R. H. (eds.): 1350-1355.
- 90- WILLIAMS, J. D. (1982). Epidemiological trends in antibiotic resistance and concerns for the future. *In: The control of antibiotic resistant bacteria*. London, *Academic Press*. STWART-HARRIS, C. H. & HARRIS, D. M. (eds). 35-36.
- 91- WHO. (WORLD HEALTH ORGANIZATION) (1991) Environmental health criteria 118. Inorganic mercury. Geneva.
- 92- WOODS, G. L. & WASHINGTON, J. A. (1995). Antimicrobial Susceptibility Tests: Dilution and Disk Difusion. *In: Manual of Clinical Microbiology*. 6 ed., Washington DC. *American Society for Microbiology*. MURRAY, P. R., BARON, E. J., PFALLER, M. A., TENOVER, F. C. & YOLKEN, R. H. (eds.): 1337-1341.