

**Andressa Marafon Semprebom**

**AUMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida albicans* À CLOREXIDINA EM  
CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE**

Curitiba

2007

**Andressa Marafon Semprebom**

**AUMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida albicans* À CLOREXIDINA EM  
CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Estomatologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Ângela Naval Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa

Curitiba

2007

S473a  
2007

Semprebom, Andressa Marafon  
Aumento da suscetibilidade de *candida albicans* à clorexidina em condições de anaerobiose / Andressa Marafon Semprebom ; orientadora, Maria Ângela Naval Machado ; co-orientador, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa. – 2007.  
56 f. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2007  
Inclui bibliografia

1. Periodontia. 2. Periodontite - Tratamento. 3. Clorexidina. 4. Candida albicans. 5. Antissépticos. I. Machado, Maria Ângela Naval. II. Rosa, Edvaldo Antonio Ribeiro. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Graduação em Odontologia. IV. Título.

CDD 21. ed. – 617.632  
616.015



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Clínica de Odontologia

## TERMO DE APROVAÇÃO

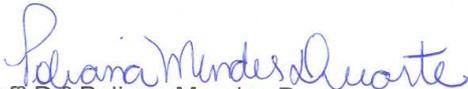
**ANDRESSA MARAFON SEMPREBOM**

### **AUMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida albicans* À CLOREXIDINA EM CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como parte dos requisitos parciais para a obtenção do Título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Estomatologia.

Orientador(a):

  
Profª Drª Maria Ângela Naval Machado  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

  
Profª Drª Poliana Mendes Duarte  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, UNG

  
Profª Drª Ana Maria Trindade Grégio  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCPR

Curitiba, 12 de março de 2007.

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

A Deus, pela constante presença em minha vida, por seu amor, pela força nos momentos de dificuldade, pela coragem nos momentos de insegurança, por iluminar meu caminho e me ajudar a seguir em frente.

A Nossa Senhora do Perpétuo Socorro, por ser meu apoio e segurança sempre, por cuidar da minha vida e do meu destino.

Aos meus pais, Waldir e Rosicléa, pelo amor, carinho e confiança, pelo apoio que me deram em todos os momentos para que eu concluísse mais esta etapa.

À minha querida irmã Alessandra, pela amizade, companheirismo e confiança.

Ao meu namorado Rafael, pelo amor, carinho, compreensão, apoio e amizade.

Aos parentes e amigos que me deram apoio e carinho, me ajudando a superar as dificuldades.

A querida amiga Ana Cláudia, pelo empenho e dedicação em me ajudar a desenvolver esta pesquisa, pela amizade, carinho e respeito.

A todos os pacientes do consultório que compreenderam a minha ausência e continuaram confiando no meu trabalho.

Muito Obrigada!

## AGRADECIMENTOS

Ao Reitor da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Professor Ivo Clemente Juliatto; ao Decano do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Professor Alberto Accioly Veiga e ao Diretor do Curso de Odontologia, Professor Monir Tacla, pelo acolhimento nesta instituição de ensino superior.

Ao Diretor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Professor Sérgio Vieira, pela confiança, oportunidade e atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. Fernando Henrique Westphalen pela coordenação da área de concentração em Estomatologia.

A orientadora Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Ângela Naval Machado, pelo acompanhamento, dedicação, paciência, confiança, pelo incentivo ao estudo, e amor à carreira acadêmica, tornando possível a realização deste trabalho.

Ao co-orientador Prof. Dr. Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa, pelo acompanhamento e apoio na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Francisco Höfling e a Dra. Letizia Monteiro de Barros, pela colaboração na pesquisa e pela gentileza em ceder ao Laboratório de Estomatologia da PUCPR, o material que foi essencial à realização desta pesquisa.

A querida professora e amiga Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marina de Oliveira Ribas, por todo carinho, amizade, dedicação, oportunidades, respeito e empenho em ensinar a arte de lecionar.

Ao Prof. Dr. Sérgio Ignácio, pelo imenso auxílio, pela dedicação, competência, paciência e pelos ensinamentos da bioestatística.

Aos professores do Programa de Mestrado em Odontologia, que com muita dedicação nos transmitiram muitos ensinamentos, entre estes a importância da constante renovação de conhecimentos. Prof. Dr. Wilson Denis Martins, Prof. Dr. Antônio Adilson Soares de Lima, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luciana Reis de Azevedo, Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Trindade Grégio, Prof. Dr. Julio Cezar Bisinelli, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Beatriz Helena Sottile França, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Paula Cristina Trevilatto, Prof. Dr. Samuel Jorge Moysés, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Tetu Moysés.

Aos queridos professores Santo Gentil Foroni, e Prof. Wilson Kenji Shiroma, pela confiança depositada durante as cirurgias, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade conquistada.

Aos queridos amigos de turma, que contribuíram para a realização deste curso, cada um do seu jeito, sempre com muito carinho e respeito. Carla, Thaís, Roberta, Elcy, Fernando, Therezinha, Patrícia e Silvana, muito obrigada pelo apoio e pela amizade.

A todos os amigos e amigas da Ortodontia e da Dentística, pela amizade e pelos momentos de distração que passamos juntos.

A grande amiga Neide Borges, pela amizade, compreensão, dedicação e apoio.

A todos os pacientes que colaboraram com a realização deste trabalho, pois sem eles nunca seria possível a realização de pesquisas clínicas.

A todos os professores da Clínica de Odontologia da PUCPR, especialmente à Prof<sup>a</sup>. Rosângela, Prof<sup>a</sup>. Sônia e Prof<sup>a</sup>. Maria Helena, pelo apoio e incentivo à pesquisa.

A todos os funcionários da Clínica de Odontologia da PUCPR, especialmente à Shirley, Aline, Irene, Silvana, Betinha, Mari, Allan, Maria por todo o auxílio prestado e amizade conquistada.

A todas as pessoas que, de qualquer maneira, contribuíram para a conclusão deste curso.

Muito obrigada!

## RESUMO

A mucosa bucal é o maior sítio de colonização por *Candida albicans*, porém outros sítios como bolsas periodontais podem abrigar este fungo. O papel da *Candida* na patogênese da periodontite é desconhecido, porém se encontra associada a uma microbiota complexa formada em sua maioria por bactérias. Com base na falta de informações sobre a atuação de fármacos utilizados no tratamento periodontal sobre a *C. albicans* isoladas de bolsas periodontais, o presente estudo se propõe a avaliar a suscetibilidade de *C. albicans* à tetraciclina, ao metronidazol e ao digluconato de clorexidina em cultura aeróbia e anaeróbia. Um total de 36 cepas de *C. albicans* foi coletado de bolsas periodontais (n=16) e de mucosa bucal (n=20) de 96 indivíduos. As cepas foram cultivadas em meio aeróbio e anaeróbio e foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (MIC) da tetraciclina, metronidazol e digluconato de clorexidina seguindo o método de microdiluição proposto pela NCCLS M27-A. A MIC da clorexidina, em aerobiose, variou entre 150µg/mL e 1200µg/mL, e, em anaerobiose de 2,34µg/mL a 37,5µg/mL. O crescimento da *C. albicans* foi resistente às outras drogas testadas, tanto em aerobiose quanto em anaerobiose, independente da procedência das cepas. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a clorexidina foi o único fármaco eficaz contra a *C. albicans*, sendo esta ação antifúngica potencializada pela condição de anaerobiose.

Palavras Chave: Suscetibilidade, *Candida albicans*, clorexidina, anaerobiose.

## ABSTRACT

The buccal mucosa is the largest colonization site of *Candida albicans*; however, other sites such as periodontal pockets can host this fungus. The role of *Candida* in the periodontitis pathogenesis is unknown, but it is associated with a complex microbiota formed, in its majority, by bacteria. Based on the relative lack of information regarding the performance of medicines used in the periodontal treatment and its performance against *C. albicans* isolated from periodontal pockets, the present study aims at the assessment of the susceptibility of *C. albicans* to tetracycline, metronidazole, and chlorhexidine digluconate in aerobic and anaerobic cultures. Thirty-six strains of *Candida albicans* were sampled from periodontal pockets (n=16) or buccal mucosa (n=20) of 96 individuals. The strains were cultivated in aerobic and anaerobic mediums; there were determined the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of tetracycline, metronidazole, and chlorhexidine digluconate following the method of microdilution proposed by NCCLS M27-A. MIC of chlorhexidine, under aerobiosis, varied between 150µg/mL and 1200µg/mL, and under anaerobiosis, between 2.34µg/mL and 37.5µg/mL. The growth of *C. albicans* resisted to other tested drugs, in either aerobiosis or anaerobiosis, independently of origin of the strains. Based on the results obtained, it is possible to conclude that chlorhexidine was the most efficient drug against *C. albicans* when tested under anaerobiosis basis.

Keywords: Susceptibility, *Candida albicans*, chlorhexidine, anaerobiosis.

## LISTA DE SÍMBOLOS

MIC	Concentração inibitória mínima
NCCLS M27-A	National Committee of Clinical Laboratory Standard, Document M27-A
$\mu\text{g/mL}$ ou $\text{mcg/mL}$	Microgramas por mililitros
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
FOP-UNICAMP	Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
GPP	Glucose Phosphate Proline
N	Número de amostras
mm	Milímetros
mM	Milimolar
G	Gramas
mL	Mililitros
%	Valores percentuais
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Fosfato de Hidrogênio
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Fosfato Sódico
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Magnésio Heptahidrato
HCl	Ácido Clorídrico
$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Cobre Hidratado
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sulfato de Zinco Heptahidratado
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de Manganês Tetra hidratado
$\text{FeSO}_4$	Sulfato Ferroso
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Cloreto de Amônia
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$\text{cels/mL}$	Células por mililitros
P	Nível de significância
BP	Bolsa Periodontal
M	Mucosa

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores da MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobianos para *C.albicans* de bolsa periodontal (BP) e mucosa (M) em aerobiose e anaerobiose. p.26

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTO ESPECIAL	iii
AGRADECIMENTO	iv
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
LISTA DE SÍMBOLOS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
ARTIGO EM PORTUGUÊS	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
<b>2.1 Amostras</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Meio GPP</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Preparo do inóculo aeróbio</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Preparo do inóculo anaeróbio</b>	<b>18</b>
<b>2.5. Ensaio de suscetibilidade</b>	<b>18</b>
3. RESULTADOS	19
4. DISCUSSÃO	19
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
TABELA	26
ARTIGO EM INGLÊS	27
1. INTRODUCTION	29
2. MATERIAL AND METHODS	30
<b>2.1 Samples</b>	<b>30</b>
<b>2.2 GPP medium</b>	<b>31</b>

<b>2.3. Aerobic inoculum preparation</b>	<b>31</b>
<b>2.4. Anaerobic inoculum preparation</b>	<b>32</b>
<b>2.5. Susceptibility</b>	<b>32</b>
3. RESULTS	33
4. DISCUSSION	33
5. TABLE	37
<b>1. Anexo I – Materiais e Métodos</b>	<b>38</b>
<b>1.1 Cepas de C.albicans</b>	<b>38</b>
<b>1.2 Seleção dos pacientes</b>	<b>38</b>
<b>1.3 Amostras</b>	<b>39</b>
<b>1.4 Identificação preliminar das amostras</b>	<b>41</b>
<b>1.5 Meio de cultura</b>	<b>41</b>
<b>1.6 Preparo do inóculo aeróbio</b>	<b>42</b>
<b>1.7 Preparo do inóculo anaeróbio</b>	<b>43</b>
<b>1.8 Suscetibilidade antifúngica</b>	<b>44</b>
<b>2. Referencias referentes a materiais e métodos</b>	<b>47</b>
<b>2. Anexo II – Análise estatística</b>	<b>48</b>
<b>3. Anexo III - Termo de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética</b>	<b>50</b>
<b>4. Anexo IV - Ficha Clínica</b>	<b>51</b>
<b>5. Anexo V – Termo de consentimento livre e informado</b>	<b>52</b>
<b>6. Anexo VI - Normas para Publicação no Journal of Periodontal Research</b>	<b>54</b>

**Artigo em Português**

## AUMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida albicans* À CLOREXIDINA EM CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE

Andressa Marafon Semprebom<sup>1</sup>, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa<sup>2</sup>, Ana Cláudia Isidoro de Azevedo<sup>1</sup>, Sérgio Aparecido Ignácio<sup>3</sup>, José Francisco Hofling<sup>4</sup>, Letizia Monteiro de Barros<sup>4</sup>, Maria Ângela Naval Machado<sup>1</sup>.

Semprebom A.M.<sup>1</sup>., Rosa E.A.R.<sup>2</sup>, Azevedo A.C.I.<sup>1</sup>, Ignácio S.A.<sup>3</sup>., Hofling J.F.<sup>4</sup>, Barros L.M.<sup>4</sup>, Machado M.A.N.<sup>1</sup>

1 Área de Estomatologia, Curso de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

2 Laboratório de Microbiologia, Curso de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

3 Área de Bioestatística, Curso de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil

4 Departamento de Microbiologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas, Brasil

**Correspondência:** Dra. Maria Ângela Naval Machado, Área de Patologia Bucal, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Brasil.

Rua Imaculada Conceição nº 1155 Prado Velho, fone/fax: 55-41-32712592/ 55-41-32711405

CEP: 80215901 Curitiba –PR, Brasil. E-mail: m.angela@pucpr.br

O e-mail do autor responsável para publicação pode ser publicado.

Titulo resumido: Suscetibilidade da *C. albicans* à clorexidina em anaerobiose.

## 1. INTRODUÇÃO

Periodontite é um processo inflamatório multifatorial que leva à destruição dos tecidos de suporte dentário.<sup>1</sup> A periodontite crônica é a mais comum das formas de doença periodontal destrutiva em adultos; é caracterizada clinicamente pela formação de bolsa periodontal e recessão gengival, em decorrência da destruição do ligamento periodontal, cemento e da perda de suporte ósseo.<sup>2</sup> O fator etiológico da doença periodontal é o biofilme dental associado ou não ao cálculo dental.<sup>3</sup>

A doença periodontal destrutiva é causada principalmente por espécies anaeróbias gram-negativas.<sup>3</sup> Na progressão da doença é relatada a colonização do sulco gengival por microrganismos, incluindo *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*.<sup>1,2</sup>

A *Candida albicans* pode ser isolada das mucosas bucais e da saliva, contudo, outros nichos intraorais, como a bolsa periodontal, também abrigam essas leveduras.<sup>4</sup> A prevalência de leveduras em bolsas periodontais varia de 14-19%.<sup>5</sup> Reynaud et al.<sup>6</sup> encontraram leveduras no interior de bolsas periodontais maiores que 7 mm em 19,7% dos indivíduos e em 15,6% dos indivíduos com bolsas menores ou iguais a 7 mm.

Um dos fatores relacionados à falta de resposta à terapia periodontal é a falha na eliminação dos reservatórios de microrganismos infecciosos, ou o aparecimento de patógenos oportunistas superinfectantes,<sup>7</sup> como enterobactérias, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* e *Candida*.<sup>8</sup>

O tratamento da doença periodontal inclui a raspagem e o alisamento radicular (RAR), associado à adequada higiene bucal. Já foi demonstrado que esses procedimentos são essenciais no sucesso da terapia periodontal reduzindo a profundidade da bolsa periodontal e a microbiota periodontopatogênica.<sup>9</sup> No entanto, existem certos pacientes que apresentam resposta negativa aos diferentes procedimentos terapêuticos, havendo perda contínua de inserção, assim o uso de antimicrobianos pode ser interessante como coadjuvante ao tratamento de RAR.<sup>2</sup>

A utilização de antibacterianos de amplo espectro, tais como tetraciclina e metronidazol, como auxiliares no tratamento periodontal tem sido um fator relevante para o desenvolvimento de superinfecções por bactérias resistentes e por leveduras do gênero *Candida*<sup>10</sup>, inclusive em pacientes portadores do HIV.<sup>11</sup> Adicionalmente, desconhece-se o papel da *C. albicans* na doença periodontal, tampouco o efeito destes fármacos isoladamente.

A menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade por diluição em ágar ou caldo é denominada Concentração Inibitória Mínima (MIC). As bactérias cujas MICs determinadas *in vitro* não podem ser obtidas *in vivo*, são consideradas resistentes ao antimicrobiano. A MIC obtida usando o teste de diluição pode mostrar qual a concentração necessária do agente antimicrobiano no sítio da infecção para inibir o organismo infectante.<sup>12</sup>

Os testes de sensibilidade são indicados para qualquer organismo de um processo infeccioso que justifique quimioterapia antimicrobiana, se sua sensibilidade não puder ser predita, de maneira confiável, a partir da identificação do organismo. Os testes de sensibilidade são iniciados, com mais frequência, quando se acredita que o organismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos mais frequentemente usados. Os principais mecanismos de resistência incluem a produção de enzimas que inativam as drogas, a alteração do sítio-alvo das drogas e a alteração da absorção ou do efluxo das drogas. Os testes de sensibilidade também são importantes nos estudos da epidemiologia da resistência e de novos agentes antimicrobianos.<sup>13</sup>

Com base na falta de informações sobre a atuação de fármacos utilizados no tratamento periodontal sobre *C. albicans* obtidas de bolsas periodontais, este estudo avaliou a suscetibilidade da levedura frente à tetraciclina, metronidazol e digluconato de clorexidina, em condições de aerobiose e de anaerobiose

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Um total de 96 indivíduos adultos apresentando periodontite crônica ou agressiva participaram do estudo, 53 pacientes da clínica odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP) e 43 da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Um total de 36 cepas de *C. albicans* foi obtido de bolsa periodontal (n=16) e de mucosa bucal (n=20). Os pacientes não apresentaram história de doença sistêmica ou terapia antibiótica sistêmica ou local nos últimos três meses. Todos os pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Informado e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Na PUCPR, as amostras subgengivais foram coletadas com curetas Gracey estéreis<sup>1</sup>. O biofilme foi coletado de bolsa periodontal com profundidade maior ou igual a 5 mm e do dorso de língua com auxílio de *swab* de algodão estéril.<sup>5</sup> Na FOP-UNICAMP, as amostras foram coletadas com cones de papel absorvente esterilizados<sup>2</sup>, inseridos nas bolsas periodontais com profundidade de sondagem acima de 3 mm e do dorso de língua com auxílio de *swab* de algodão estéril.

O total de amostras dos sítios subgengivais e de mucosa bucal obtidas foram semeadas em CHROMagar *Candida*<sup>®3</sup> e incubadas a 37°C por 48 horas.<sup>14</sup> Após o desenvolvimento das culturas, as colônias compatíveis com *C. albicans* foram recolhidas e isoladas.<sup>15</sup> Todos os isolados foram identificados, crescidos a 35°C em Ágar Sabouraud Dextrose<sup>4</sup> <sup>16</sup> e armazenados em tubos de cultura, mantidos sob refrigeração.

## 2.2. Meio GPP

O meio de cultura GPP (Glucose Phosphate Proline), descrito por Dumitru *et al.* (2004)<sup>16</sup> foi modificado e utilizado para simular o ambiente subgengival *in vitro*. GPP é um meio de cultura contendo 4g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3,2g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2g de L-prolina e 0,7g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (por 900 mL de água destilada). A L-prolina foi substituída por 0,5g de L-lisina e 1g de extrato de levedura. Depois de autoclavado, o meio recebeu 40 mL de glucose 20%, 0,5 mL de mistura vitamínica e 0,25 mL de mistura mineral. A mistura de vitaminas contém (em 100mL de etanol) 2g de biotina, 20mg de tiamina-HCl e 20mg de piridoxidina-HCl. A mistura de minerais contém (em 100mL de HCl 0,1M) 0,5g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,5g de ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,8g de MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O e 0,5g de FeSO<sub>4</sub>. As misturas de vitaminas e de minerais foram filtradas em 0,22µm<sup>5</sup> e em temperatura de 4°C. Para crescimento anaeróbico de *C. albicans*, o meio GPP foi suplementado com 200µL de 1mM de ácido oléico em 100% de metanol, 200µL de 4mM de ácido nicotínico e 1mL de NH<sub>4</sub>Cl 500mM. O pH foi corrigido para 5,0. O meio GPP modificado foi distribuído em placas de microdiluição de 96 poços<sup>6</sup> (100µl/poço) e armazenado a -20°C.

<sup>1</sup> Trinity<sup>®</sup>, SP, Brasil

<sup>2</sup> 35-55, Endopoints Industria e Comércio Ltda. Brasil

<sup>3</sup> CHROMagar Microbiology, BioMeriux, Paris, France

<sup>4</sup> Himedia Laboratories Ltd, Mumbai, India

<sup>5</sup> Whatman, Maidstone, United Kingdom

<sup>6</sup> Difco Lab, Detroit, USA

### 2.3. Preparo do inóculo aeróbio

As cepas de ambos os sítios anatômicos foram inoculadas em 3mL de caldo Sabouraud Dextrose e incubadas em aerobiose a 35°C por 24 horas. Após o crescimento as células foram colhidas, lavadas três vezes em água deionizada esterelizada, suspensas até  $2 \times 10^7$  células/mL e armazenadas à 4°C.

### 2.4. Preparo do inóculo anaeróbio

As cepas de ambos os sítios anatômicos foram inoculadas em 3mL de GPP modificado e incubadas anaerobicamente em jarra GasPak com dispositivo Anaerobac<sup>7</sup> a 35°C, por 48 horas. As células obtidas foram reinoculadas em 3mL de GPP modificado e novamente incubadas anaerobicamente a 35°C por 48 horas. Este procedimento visa tornar as células totalmente adaptadas às condições de anaerobiose. Após o crescimento as células foram colhidas, lavadas três vezes em água deionizada esterelizada, suspensas até  $2 \times 10^7$  células/mL e armazenadas à 4°C.

### 2.5. Ensaio de suscetibilidade

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima de cada uma das drogas usadas neste estudo (tetraciclina<sup>8</sup>, metronidazol<sup>9</sup> e digluconato de clorexidina<sup>10</sup>), foi usada a técnica de microdiluição em caldo. Todas as drogas foram diluídas em GPP modificado e transferidas para as placas de microtitulação de forma a se obter uma escala com doze poços com concentração decrescente (metronidazol 6400 - 3,125 µg/mL, clorexidina 4800 - 2,34 µg/mL e tetraciclina 400 - 0,195 µg/mL). Cada poço foi inoculado com 10µl de suspensão de *C. albicans*, obtendo-se densidades celulares finais de  $10^6$  cels/mL. As placas de microdiluição foram incubadas a 35°C, sem agitação em atmosferas aeróbia e anaeróbia (GasPak com

---

<sup>7</sup> Probac do Brasil, Produtos bacteriológicos Ltda.

<sup>8</sup> Genix Industria Farmacêutica Ltda, Brasil

<sup>9</sup> Purifarma Dist. Prod. Farmacêuticos, Brasil

<sup>10</sup> Pharma Nostra Dist. Prod. Farmacêuticos, Brasil

Anaerobac<sup>11</sup>). O crescimento foi monitorado por 24-48 horas (aerobiose) e 72 horas (anaerobiose). Os crescimentos nos diferentes poços contendo os agentes antimicrobianos foram comparados visualmente com os crescimentos nos poços-controle, sem fármacos. A leitura das placas foi feita por um único examinador, treinado e calibrado.

O teste não-paramétrico U de Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ) foi usado para comparar o efeito dos antimicrobianos sobre o crescimento de *C. albicans* proveniente de mucosa bucal e bolsa periodontal em aerobiose e anaerobiose.

### 3. RESULTADOS

Foi encontrada uma prevalência de 16,6% de *C. albicans* em bolsas periodontais. Todas as cepas testadas foram resistentes ao metronidazol e à tetraciclina e demonstraram concentrações inibitórias mínimas superiores a 6400µg/mL e 400µg/mL respectivamente, independentemente da atmosfera de incubação ou da procedência das cepas, mucosa ou bolsa periodontal, conforme se observa na tabela 1.

O digluconato de clorexidina foi efetivo na contenção do crescimento de todos os isolados de *C. albicans*, tanto em aerobiose, quanto em anaerobiose. As MICs em aerobiose variaram entre 150µg/mL e 1200µg/mL; em ambiente anaeróbico variaram entre 2,34µg/mL e 37,5µg/mL. O teste não-paramétrico U de Mann-Whitney demonstrou redução da resistência das cepas frente à clorexidina quando crescidas em anaerobiose ( $P < 0,0001$ ). O mesmo teste demonstrou não haver diferença estatística significativa das MICs em função da procedência anatômica das cepas ( $P = 0.9584$ ), conforme apresentado na tabela 1.

### 4. DISCUSSÃO

Estudos demonstram<sup>8,17</sup> correlação entre fungos e *Eubacterium saburreum* e *Actinomyces* em bolsas periodontais, sugerindo que a coagregação desses microrganismos é importante na colonização de sítios bucais.

A *C. albicans* é um comensal aeróbico que coloniza a língua, o palato e a mucosa bucal<sup>18</sup>, porém já foram isoladas cepas de *C. albicans* de bolsas periodontais em indivíduos

---

<sup>11</sup> Probac do Brasil, Produtos Bacteriológicos Ltda.

com periodontite crônica.<sup>4,6,19</sup> A prevalência mundial da espécie em bolsas periodontais varia entre 14%<sup>5</sup> e 19%<sup>10</sup>, podendo chegar a 27%<sup>6</sup>. No presente estudo a prevalência foi de 16,6% (16/96), o que corrobora com os resultados publicados pelos diferentes autores.

A *C. albicans* apresenta importantes fatores de virulência, como atividade proteolítica, habilidade de aderência e de invadir o epitélio, podendo, teoricamente, agir com maior patogenia em algumas formas de doença periodontal.<sup>8,19</sup> Entretanto, a presença de *Candida* na bolsa periodontal pode não estar associada particularmente com a periodontite, podendo não ser considerada como microrganismo da microbiota periodontal<sup>8</sup> e sua presença pode ser transitória.<sup>6</sup>

A antibioticoterapia é indicada para portadores de periodontite em contínua evolução que realizaram o tratamento mecânico convencional sem sucesso, para indivíduos com risco aumentado de perda de inserção clínica por periodontite agressiva e que fazem parte de grupos de risco, como diabéticos, fumantes e que apresentam imunossupressão.<sup>20</sup>

Antibióticos sistêmicos atuam sobre microrganismos na base de bolsas periodontais profundas, áreas de furca e no epitélio ou tecido conjuntivo gengival. A possibilidade do decréscimo ou da eliminação de patógenos periodontais pode reduzir o risco de futura recolonização da bolsa e recorrente progressão da doença. Desvantagens da terapia sistêmica quando comparada a aplicações locais de antimicrobianos incluem a incapacidade de atingir altas concentrações no fluido gengival, reações adversas da droga e seleção de microrganismos resistentes.<sup>20</sup> Por esse motivo testou-se no presente estudo, medicamentos utilizados na terapia periodontal de forma sistêmica, como a tetraciclina e o metronidazol, e medicamentos usados de forma tópica, como a clorexidina.

A irrigação subgengival com antimicrobianos, combinada com raspagem e alisamento radicular, diminui os patógenos presentes na bolsa, reduz a profundidade de sondagem, a formação do biofilme dental e os índices de sangramento gengival. Não há estudos que comprovem a resistência adquirida de microrganismos após longos períodos de uso da clorexidina em humanos.<sup>21</sup>

A clorexidina é um antisséptico de amplo espectro com efeitos antimicrobianos para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, assim como, para fungos e alguns vírus.<sup>21</sup> Devido a alta afinidade da clorexidina a superfícies bucais, elevadas concentrações do componente podem ser observados na saliva por várias horas após uma única dose. Em baixas concentrações, a clorexidina causa dano na membrana celular e dispersão de moléculas de baixa massa molar dos microrganismos. Isto pode justificar os resultados encontrados no presente estudo, que demonstra que concentrações muito reduzidas de clorexidina são capazes

de inibir a proliferação de *C. albicans*. Em alta concentração, a clorexidina causa precipitação e coagulação de proteínas do citoplasma de microrganismos expostos.<sup>21</sup>

Dumitru *et al.*<sup>16</sup>, revelaram que em anaerobiose o crescimento celular de *C. albicans* foi muito mais resistente que em aerobiose para testes com antifúngicos. Encontraram também que a *C. albicans* não requer ergosterol para crescimento em anaerobiose. Anaerobicamente, o crescimento celular é mais lento e o déficit de oxigênio induz o crescimento micelial. Os autores concluíram que em anaerobiose a *C. albicans* não usa o mesmo sistema fisiológico para crescimento que em meio aeróbio.<sup>16</sup>

A resistência de *C. albicans* para antifúngicos se deve à ausência de ergosterol na membrana celular da levedura<sup>16</sup>, porém a suscetibilidade desse microrganismo frente à clorexidina em ambiente livre de oxigênio pode ser melhor discutida. Sabe-se que o oxigênio é um elemento com carga negativa e que a clorexidina é carregada positivamente.<sup>22</sup> Possivelmente, a clorexidina se liga às moléculas de oxigênio, quando este está presente. Em anaerobiose a clorexidina tem maior afinidade às superfícies negativas de microrganismos como bactérias e fungos. Isto explicaria o fato de medicamentos como a clorexidina agirem de forma diferente sobre essas leveduras, quando presentes em ambiente com baixíssimas concentrações parciais de oxigênio.

Até o presente momento, pesquisas com *C. albicans* isoladas de bolsa periodontal não tinham sido testadas com antimicrobianos em anaerobiose. Os testes em ambiente livre de oxigênio simulam o ambiente anaeróbio encontrado no biofilme no interior de bolsas periodontais. A clorexidina mostrou eficácia na redução da *C. albicans* presente no biofilme de bolsas periodontais, embora permaneça desconhecido o papel da *C. albicans* na patogênese da periodontite.

No presente estudo verificou-se a baixa resistência da *C. albicans* à clorexidina em anaerobiose e uma maior resistência quando em aerobiose. Considerando que no biofilme periodontal o ambiente é livre de oxigênio, pode-se sugerir uma melhor ação da clorexidina sobre a *C. albicans* presente na bolsa periodontal.

Assim como Kuhn *et al.*<sup>23</sup> e Theráud *et al.*<sup>24</sup>, Lamfon *et al.*<sup>25</sup> verificaram que uma mesma cepa de *C. albicans* quando crescida em biofilme se torna até oito vezes mais resistente à clorexidina que quando crescida em fase planctônica. Contudo, nesses estudos, a suscetibilidade da levedura foi determinada em condições de aerobiose para células crescidas também em aerobiose, tanto para formas planctônicas quanto para biofilme. Quando contrastamos os resultados do presente estudo com os de Lamfon *et al.*<sup>25</sup>, observamos que a atividade fungicida da clorexidina em aerobiose não sofreu grandes variações. Porém, nossos

ensaios em condições de anaerobiose mostraram um incremento na eficiência da bisbiguanida de até mil duzentos e trinta (1.230) vezes. Tais discrepâncias entre as MICs dos dois estudos, supostamente se devem às diferenças fisiológicas das células ou a uma maior biodisponibilidade da clorexidina em anaerobiose.

O mecanismo pelo qual ocorreria essa elevação na taxa de eficiência da clorexidina em ambiente anaeróbio ainda não está devidamente estabelecido. Nós postulamos que em anaerobiose, as moléculas da clorexidina não concorreriam com as moléculas de oxigênio dispersas pelos sítios de ligação. Desta forma, uma menor quantidade de moléculas seria requerida para inibir a viabilidade fúngica, incorrendo numa redução dos valores das MICs.

Substâncias antibacterianas de amplo-espectro como as tetraciclinas são usadas como auxiliares no tratamento convencional de periodontites agressivas e de periodontites que não respondem a tratamento convencional. Após tratamento prolongado com essas drogas observa-se que superinfecções por *Candida* podem surgir na bolsa periodontal.<sup>19</sup> É previamente reconhecido que os sintomas de candidíase podem aumentar durante a terapia com metronidazol.<sup>26</sup> No presente estudo houve alta resistência da *C. albicans* a tetraciclina e ao metronidazol, confirmando os resultados anteriores que citam a resistência do fungo a esses agentes antimicrobianos.<sup>18, 26</sup>

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que a clorexidina foi o único fármaco eficaz na contenção do crescimento da *C. albicans* proveniente da bolsa periodontal, quando testado em anaerobiose. A *C. albicans*, proveniente da bolsa periodontal foi resistente à tetraciclina e ao metronidazol em aerobiose ou anaerobiose. A procedência das cepas, mucosa ou bolsa periodontal, não interferiu no crescimento das mesmas em aerobiose ou anaerobiose.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Apatzidou DA, Riggio MP, Kinane DF. Quadrant root planing versus same-day full-mouth root planing II. Microbiological findings. *J Clin Periodontol* 2004; 31: 141-148.
2. Tozum TF, Yildirim A, Caglayan F, Dincel A, Bozkurt A. Serum and gingival crevicular fluid levels of ciprofloxacin in patients with periodontitis. *J Am Dent Assoc.* 2004;135(12):1728-1732.
3. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994, 5:78-111.
4. Song X, Sun J, Hansen BF, Olsen I. Oral distribution of genera, species and biotypes of yeasts in patients with marginal periodontitis. *Microb Ecol Health Dis* 2003; 15:114-119.
5. Hannula J, Dogan B, Slots J, Ökte E, Asikainen S. Subgingival strains of *Candida albicans* in relation to geographical origin and occurrence of periodontal pathogenic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2001;16:113-118.
6. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 860-864.
7. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the american academy of periodontology – An update. *J Can Dent Assoc* 2000; 66:594-597.
8. Oliveira LF, Jorge AOC, Santos SSF. *In vitro* minocycline activity on superinfecting microorganisms isolated from chronic periodontitis patients. *Braz. Oral Res* 2006;20(3):202-206.
9. Darby IB, Mooney J, Kinana DF. Changes in subgingival microflora and humoral immune response following periodontal therapy. *J Clin Periodontol* 2001; 28: 796-805.
10. Dahlén G, Wikström M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and *Candida* in subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1995; 10: 42-46.
11. Odden K, Schenck K, Koppang HS, Hurlen B. Candidal infection of the gingiva in HIV-infected persons. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 178-183.

12. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother* (2001) 48, *Suppl. S1*, 5-16.
13. National Committee of Clinical Laboratory Standard (NCCLS). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.
14. Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses* 2003;15: 114-119.
15. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing yeast isolates. *Acta Odont Scand* 1990; 48: 27-36.
16. Dumitru R, Hornby JM, Nickerson KW. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2350–2354.
17. Grimaudo NJ, Nesbitt WE, Clark WB. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11: 59-61.
18. Dahle UR, Olsen I. Anaerobiosis and serum promote mycelium formation by *Candida albicans* in colonies on TSBV agar. *Acta Odontol Scand* 1991; 49: 41-45.
19. Järvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. *Candida* yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases* 2004; 10: 106-112.
20. Position Paper. Review. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol.* 1996; 67(8):831-838.
21. Sekino S, Ramberg P, Guzin Uzel N, Socransky S, Lindhe J. The effect of a chlorhexidine regimen on de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 2004; 31:609–614.
22. Goultschin J, Levy H. Inhibition of superoxide generation by human polymorphonuclear leukocytes with chlorhexidine. Its possible relation to periodontal disease. *J Periodontol.* 1986; 57(7):422-425.

23. Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *C.albicans* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandis. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6):1773-1780.
24. Théraud M, Bédouin Y, Guiguen C, Gangneux JP. Efficacy of antiseptics and disinfectants on clinical and environmental yeast isolates in planktonic and biofilm conditions. *Journal of Medical Microbiology* 2004; 53: 1013–1018.
25. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Susceptibility of *Candida albicans* biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: a longitudinal study. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53: 383–385.
26. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993; 64: 155-161.

## TABELA

**Tabela 1.** Valores da MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobianos para *C.albicans* de bolsa periodontal (BP) e mucosa (M) em aerobiose e anaerobiose.

Variáveis	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Aerobiose		Anaerobiose	
	BP (n=16)	M (n=20)	BP (n=16)	M (n=20)
<b>Metronidazol</b>	>6400	>6400	>6400	>6400
<b>Tetraciclina</b>	>400	>400	>400	>400
<b>Clorexidina</b>	150 –1200 <sup>*§</sup>	150 –1200 <sup>*§</sup>	2,34 - 37,5 <sup>*‡</sup>	2,34 - 37,5 <sup>*‡</sup>

MIC: Concentração Inibitória Mínima

Número total de cepas: 36

Teste U de Mann-Whitney

\* Diferença estatística significativa para a variável “antimicrobianos” ( $P < 0,0001$ )

§ ‡ Diferença estatística significativa para a variável “ambientes” ( $P < 0,0001$ )

## **Artigo em Inglês**

**SUSCEPTIBILITY INCREASE OF *Candida albicans* TO CHLORHEXIDINE UNDER ANAEROBIOSIS CONDITION**

Andressa Marafon Semprebom<sup>1</sup>, Edvaldo Antonio Ribeiro Rosa<sup>2</sup>, Ana Cláudia Isidoro de Azevedo<sup>1</sup>, Sérgio Aparecido Ignácio<sup>3</sup>, José Francisco Hofling<sup>4</sup>, Letizia Monteiro de Barros<sup>4</sup>, Maria Ângela Naval Machado<sup>1</sup>.

Semprebom A.M.<sup>1</sup>., Rosa E.A.R.<sup>2</sup>, Azevedo A.C.I.<sup>1</sup>, Ignácio S.A.<sup>3</sup>., Hofling J.F.<sup>4</sup>, Barros L.M.<sup>4</sup>, Machado M.A.N.<sup>1</sup>

1 Stomatology Area, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil

2 Laboratory of Stomatology, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil

3 Bioestatistic Area, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Parana, Curitiba, Brazil

4 Department of Microbiology, School of Dentistry of Piracicaba, University of Campinas, Brasil

Short Running Title: Susceptibility of *C.albicans* to chlorhexidine in anaerobiosis.

**Correspondence:** Maria Ângela Naval Machado, School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Paraná, Curitiba, Brazil. Rua Imaculada Conceição 1155 Prado Velho, phone/fax: 55-41-32711637 CEP: 80215901 Curitiba – PR, Brasil. E-mail: m.angela@pucpr.br

The e-mail of author responsible for publication can be published.

Keywords: Susceptibility, *Candida albicans*, chlorexidine, anaerobiosis.

## 1. INTRODUCTION

Periodontitis is a multifactorial inflammatory disease process, leading to destruction in the periodontium of the tissues supporting the teeth (1). Chronic periodontitis is characterized occurring mostly in adults; it is characterized clinically by the pocket formation and recession of the gingivae due to the destruction of the periodontal ligament, cement and/or bone support (2). The etiological factor of periodontal disease is the dental biofilm associated or not to calculus (3). Progression of the disease is related to the colonization of microorganisms in the gingival crevice, including *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythensis*, and *Treponema denticola* (1,2).

*Candida albicans* can be sampled from the buccal mucosa and saliva; however, other intraoral niches as periodontal pocket can also host these yeast (4). The prevalence of yeasts in periodontal pockets has been reported to be 14-19% (5). Reynaud et al. (6) have found yeasts inside periodontal pockets over 7 mm depth in 19.7% of the individuals and 15.6% of subjects with pockets less or equal to 7mm.

The treatment of periodontal disease is scaling and root planning (SRP), associated with oral hygiene instruction. There is considerable evidence supporting SRP as an essential and effective component of therapy, reducing the deeper of periodontal pocket and in the microbiota following SRP (7). The main factors related to periodontal therapy insuccess is the failure in eliminating the reservoir of periodontal pathogens or the emergence of superinfectious micoorganisms (8), such as enterobacteria, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, and *Candida* (9).

However, the disease progresses despite periodontal debridement and the use of antibiotics as an adjunctive therapy has been interest in the treatment of periodontal diseases (2). In some situations the use of antibiotics may suppress the normal mucosal microbiota, allowing an increase susceptibility microorganisms, causing a superinfection by resistant bacteria and by yeasts of the genera of *Candida* (10), even in HIV-infected persons (11).

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) are defined as the lowest concentration of an antimicrobial agent that will inhibit the visible growth of a microorganism in tests of sensitivity through dilution in agar or broth cultures. The bacteria whose MICs was determined *in vitro*, but can not be determined *in vivo*, are considered resistant to the

antimicrobial. The MICs obtained through test of dilution can show which concentration of the antimicrobial are necessary in the site of infection to inhibit the growing organism (12).

The sensitivity tests are recommended for an organism contributing to any infectious process that requires antimicrobial chemotherapy and its sensitivity cannot be reliably predicted through its identity. The sensitivity tests are indicated, more often, when the causing organism belongs to a species able to present resistance to most the used antimicrobials. The main mechanisms of resistance are the production of enzymes that inactivate the drugs, the change of the target-site of the drugs, and the change of the absorption or efflux of the drugs. The sensitivity tests are also important for the studies of epidemiology of the resistance and new antimicrobials (13).

Based on the relative lack of information regarding the performance of medicines used in the periodontal treatment and their action on *C. albicans* in periodontal pockets, the aim of the study was to assess the susceptibility of *C. albicans* to tetracycline, metronidazole, and chlorhexidine digluconate under aerobic and anaerobic conditions.

## **2. MATERIAL AND METHODS**

### **2.1 Sampling**

Thirty six subgingival *C. albicans* isolates were obtained from the microbiology laboratories at the *School of Dentistry at Piracicaba, UNICAMP (FOP-UNICAMP)* and *School of Dentistry, Pontifical Catholic University of Parana (PUCPR)*. Clinical yeasts isolates originated from 53 consecutive *C. albicans* positive dental clinic patients from FOP-UNICAMP (mean age 40,5 years, SD 10,15 years; 33 women and 20 men) and from 43 patients from PUCPR ( mean age 43,1 years, SD 12,5 years, 22 women and 21 men).

Subgingival microbial samples were collected from the most inflamed periodontal sites, which were characterized with gingival bleeding, and clinical and/or radiological periodontal attachment loss (periodontal pockets of 4 mm or more). The samples were collected with Gracey curette in PUCPR (from two sites) and with sterilized paper points (35-55, EndoPoints Ind. Co. Ltd., São Paulo, SP, Brazil) in the FOP-UNICAMP (from six sites). Mucosa samples were taken by streaking the sites with sterile cotton-tipped swabs. The

exclusion criteria were history systemic diseases or usage of local and systemic antibiotics in the last 3 months. The research was approved by the Research Ethics Committee.

The total of obtained samples from the subgingival sites and buccal mucosa were transferred to CHROMagar *Candida*<sup>®</sup> (CHROMagar Microbiology, BioMeriux, Paris, France) and incubated at 37°C for 48 hours (14). After the development of the cultures, the colonies compatible with *C. albicans* were collected and isolated (15). All the isolates were identified, grown at 30°C in Sabouraud Dextrose Agar (Himedia Laboratories Ltd., Mumbai, India ) (16) and placed in tubes of culture and kept under refrigeration.

## 2.2 Media

The GPP medium, described by Dumitru *et al.* (16), was modified and used to simulate the subgingival environment *in vitro*. GPP is a medium of culture that contains (per 900 mL of distilled water) 4g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.2g of NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2g of L-proline, and 0.7g of MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O. L-proline was replaced for 0.5g of L-lysine and 1g of yeast extract. After autoclaving, the medium received 40 mL of glucose at 20%, 0.5 mL of vitamin mixture, and 0.25 mL of mineral mixture. The vitamins mix contains (per 100mL of 20% ethanol) 2g of biotin, 20mg of thiamine-HCl, and 20mg of pyridoxine-HCl. The mineral mix contains (per 100mL of HCl 0.1M) 0.5g of CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0.5g of ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.8g of MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O, and 0.5g of FeSO<sub>4</sub>. The vitam mix and mineral mix were filter sterilized through 0.22µm pore size (Whatman, Maidstone, United Kingdom ) cellulose nitrate filters and stored at 4°C. For anaerobic growth of *C. albicans*, regular GPP medium was supplemented, , with 200µl of 1mM of oleic acid in 100% methanol, 200µl of 4mM of nicotinic acid, and 1mL of 500mM NH<sub>4</sub>Cl. The pH complete defined growth medium was 5.0. The modified GPP medium was distributed in microdilution plates of 96 wells (Difco Lab, Detroit, USA ) (100µl/well) and stored at -20°C.

## 2.3. Aerobic inoculum preparation

The strains from two anatomic sites were inoculated in 3mL of Sabouraud Dextrose caldo and incubated under anaerobiosis at 30°C for 24 hours. After growth, the cells were

harvested, washed three times in deionised, sterilized water, suspended until  $2 \times 10^7$  cells/mL and stored at 4°C.

#### **2.4. Anaerobic inoculum preparation**

The strains from two anatomic sites were inoculated in 3mL of modified GPP and incubated anaerobically in GasPark jar supplied with a Anaerobac disposable (Probac do Brasil, Produtos bacteriológicos Ltda.) at 30°C for 48hours. The obtained cells were re-inoculated in 3mL modified GPP and newly incubated anaerobically at 30°C for 48 hours. This procedure aims to turn the cells totally adapted to the anaerobic condition. After the growth of the cells, there were harvested, washed three times in deionised, sterilized water, suspended until  $2 \times 10^7$  cells/mL and stored at 4°C.

#### **2.5. Susceptibility**

The technique of broth microdilution was used for determining the Minimum Inhibitory Concentration of each one of the drugs used in this study: tetracycline (Genix Ind. Pharm. Ltd., Anápolis, GO, Brazil), metronidazole (Purifarma Dist. Prod. Pharm., São Paulo, SP, Brazil) and chlorexidine digluconate (Pharma Nostra Dist. Prod. Pharm., São Paulo, SP, Brazil). All drugs were diluted in modified GPP and transferred to microdilution plates for obtaining a scale of twelve wells with decreasing concentration (metronidazole 6400-3.125 µg/mL, chlorhexidine 4800-2.34 µg/mL, and tetracycline 400-0.195 µg/mL). Each well was inoculated with 10µl of suspension of *C. albicans*, obtaining final densities of  $10^6$  cells/mL. The microdilution plates were incubated at 35°C without agitation under aerobic and anaerobic atmospheres. The anaerobic environment were simulated using GasPak System (Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, Md.). The growth was monitored for 24-48 hours in aerobiosis and 72 hours in anaerobiosis. The growths at different wells containing the antimicrobials were visually compared with the growths in the check wells.

Mann-Whitney rank sum test ( $P < 0.05$ ) was carried out to test the hypothesis that there were no differences between the effect of antimicrobials on the growth of *C. albicans* from the buccal mucosa and periodontal pocket under aerobic and anaerobic conditions.

### 3. RESULTS

In the present study, it was found a prevalence of 16.6% of *C.albicans* in periodontal pockets. All tested strains were resistant to metronidazole and to tetracycline and demonstrated MIC superior to 6400µg/mL and 400µg/mL, respectively, independently of the atmosphere of incubation or of origin of the strains (mucosa or periodontal pocket), according to table 1.

The chlorhexidine digluconate was effective in the growth restrain of all *C. albicans* strains with MIC values varying from 150µg/mL to 1,200µg/mL, in aerobic conditions and 2.34µg/mL to 37.5µg/mL, in anaerobiosis. The Mann-Whitney U test has demonstrated a significant reduction of the strains' resistance to chlorhexidine under anaerobiosis ( $P < 0.0001$ ). This test also showed no statistically significant difference of MICs in relation to of anatomic origin of strains ( $P = 0.9584$ ), according to table 1.

### 4. DISCUSSION

Studies show a correlation among *C. albicans* and *Eubacterium saburreum* (8) and *Actinomyces* (17) in periodontal pockets, suggesting that the coaggregation of these microorganisms is important in the colonization of buccal sites.

*C. albicans* is an aerobic commensal that colonizes the tongue, palate, and buccal mucosa (18), however, it has been also isolated strains of *C. albicans* from periodontal pockets in individuals with chronic periodontitis (4,6,19). The worldwide prevalence of the species in periodontal pockets varies between 14 and 19% (5,10), reaching 27% (6). In the present study, it was found a prevalence of 16.6% of *C.albicans* (16/96) in periodontal pockets of individuals with chronic periodontitis. This data corroborate at from previous studies.

*C. albicans* produces important factors of virulence such as proteolytic activity, ability of adherence, and epithelium invasion (8,19). Although the presence of *Candida* in the periodontal pocket might not be associated particularly with periodontitis, being its presence transitory, it could act with more pathogeny some forms of periodontitis diseases (6).

Local or systemic antibiotic therapy is recommended as coadjuvat to conventional mechanical treatment without success, and for aggressive periodontitis individuals. Systemic antibiotics can act on microorganisms present in the apical area of the deep periodontal

pockets, furcation areas, and gingival tissue. The pathogens elimination may reduce the risk of future re-colonization of the pocket and recurring progression of the disease. Disadvantages of the systemic antimicrobial therapy includes, when compared to local applications, inability to reach high concentrations in the gingival fluid, drug adverse reactions, and selection of resistant microorganisms (20). In this study it was evaluated the antimicrobial capacity of two drugs commonly used for systemic therapy of periodontal disease (tetracycline and metronidazole) and one widely indicated for local administration (chlorhexidine digluconate).

The subgingival irrigation with antimicrobials associated with scaling and root planning reduce the pathogens present in the pocket, reduces the probing depth, dental biofilm, and the indexes of gingival bleeding. There is no study that proves the acquired resistance of microorganisms after long periods of use on chlorhexidine in humans (21).

Chlorhexidine is a local antiseptic of wide range with antimicrobial effect to Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as to fungi and some viruses. Due to the high affinity to buccal surfaces, high levels of the component can be observed in the saliva during several hours after the application of a unique dose. Under low concentrations, the chlorhexidine causes damages in the cellular membrane and dispersion of low molar weight molecules of the microorganisms. These are possible explanation for the results of the considerable both low and high concentrations of chlorhexidine inhibited the proliferation of *C. albicans*. Under high concentrations, chlorhexidine causes the precipitation and coagulation of proteins of the cytoplasm in exposed microorganisms (21).

Dumitru et al. (16) revealed that under anaerobiosis, the *C.albicans* growth was more resistant than under aerobiosis for antifungals tests. They have also found that *C.albicans* does not require ergosterol for growing in anaerobiosis. Anaerobically, the cellular growth is slower and the oxygen deficit induces the mycelial growth. The authors have concluded that under anaerobiosis, *C.albicans* does not use the same physiological system for growing when it is under aerobic environment (16).

The *C.albicans* resistance to antifungals is due to the lack of ergosterol in the cellular membrane of yeast (16); however, the susceptibility of these microorganisms to chlorhexidine under a environment free of oxygen can be better discussed. It is well-known that oxygen is an element positively charged (22). Possibly, chlorhexidine bonds itself to oxygen molecules when they are present. Oppositely, under anaerobiosis, chlorhexidine has more affinity to negative surfaces of microorganisms such bacteria and fungi; this explains the fact of medicines as chlorhexidine acting in such different way on these yeasts when under anaerobic environment.

Until the present moment, researches with *C. albicans* isolated from the periodontal pocket were not tested with antimicrobials under anaerobiosis. The tests in environment free of oxygen simulate the anaerobic environment found in the biofilm inside the periodontal pockets. The chlorhexidine has shown effectiveness in the reduction of *C. albicans* present in the biofilm of periodontal pockets, despite the unknown role that *C. albicans* plays in the pathogenesis of periodontitis.

In the present study, there was verified the low resistance of *C. albicans* to chlorhexidine under anaerobiosis, and a high resistance under aerobiosis. Taking into account that in the periodontal biofilm the environment is free of oxygen, it is possible to suggest a better action of chlorhexidine on *C. albicans* present in the periodontal pocket.

As Kuhn *et al.*(23) and Theráud *et al.*(24), Lamfon *et al.*(25) have verified that the same yeast of *C. albicans* when grown in biofilm becomes up to eight times more resistant to chlorhexidine than when grown under planktonic phase. However, in these studies, the susceptibility of yeast was determined under aerobiotic conditions for cells grown also under aerobiosis, for either planktonic or biofilm form. When we contrasted the results of the present study with those of Lamfon *et al.* (25), we have got that the fungicide activity of chlorhexidine under aerobiosis has not suffered large variations; nevertheless, our assays under anaerobiotic conditions have shown an increment in the efficiency of bisbiguanide that varied from eleven to one hundred sixty four, and from eighty to one thousand two hundred and thirty times for planktonic cells and cells under biofilm, respectively. Such discrepancies among MICs of those two studies might be supposedly due to the physiological differences of the cells or to higher bioavailability of chlorhexidine under anaerobiosis.

Antibacterial substances of wide-spectrum such tetracycline are used as supplements for the conventional treatment of periodontitis. After the treatment prolonged with such drugs, it is observed that super-infections caused by *Candida* may occur in the periodontal pockets<sup>18</sup>. It is also previously known that the symptoms of candidiasis may increase during the therapy with metronidazole (26). In the present study, there was high resistance of *C. albicans* to tetracycline and to metronidazole, confirming, therefore, the previous results about the resistance of the fungus to these antimicrobials (19,26).

According to the results obtained in this study, it is possible to conclude that chlorhexidine was the unique effective medicine in the restraint of the growth of *C. albicans* from the periodontal pocket when tested under anaerobiosis. *C. albicans* from periodontal pocket was resistant to tetracycline and metronidazole under either aerobiosis or anaerobiosis

conditions. The origin of the strains (mucosa or periodontal pocket) did not influence *C.albicans* growth under either aerobiosis or anaerobiosis.

## 5. TABLE

**Table 1.** MICs values ( $\mu\text{g/mL}$ ) from antimicrobial to *C.albicans* from periodontal pocket (PP) and mucosa (M) in aerobiosis and anaerobiosis.

Variables	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	Aerobiosis		Anaerobiosis	
	PP (n=16)	M (n=20)	PP (n=16)	M (n=20)
<b>Metronidazole</b>	>6400	>6400	>6400	>6400
<b>Tetracycline</b>	>400	>400	>400	>400
<b>Chlorhexidine</b>	150 –1200*§	150 –1200*§	2,34 - 37,5*‡	2,34 - 37,5*‡

MIC: Mimum Inibitory Concentration

Total number strins: 36

U de Mann-Whitney Test

\* Significant statistic differences to variable “antimicrobials” (P<0,0001)

§ ‡ Significant statistic differences to variable “environment” (P<0,0001)

## ANEXOS

### 1. Anexo I – Materiais e Métodos

#### 1.1 Cepas de *C.albicans*

Um total de 36 cepas de *Candida albicans* foi obtido a partir de pacientes atendidos na Clínica Odontológica da PUCPR e da FOP-UNICAMP. Foram obtidas 12 cepas de 43 indivíduos de ambos os gêneros (22 mulheres e 21 homens), com idade entre 20 e 77 anos (média de 43,1 +- 12,5 anos), apresentando diagnóstico de doença periodontal, crônica ou agressiva (Armitage, 1999; Wiebe & Putnins 2000), atendidos na Clínica Odontológica da PUCPR. Seis cepas da bolsa periodontal e outras 6 coletadas na mucosa do dorso da língua.

Outras 24 cepas de cinquenta e três indivíduos (33 mulheres e 20 homens), com idades entre 23 e 61 anos (média de 40,5 ± 10,15 anos), apresentando periodontite crônica ou agressiva, foram enviadas da Clínica Odontológica da FOP- UNICAMP. Dez cepas coletadas da bolsa periodontal e as outras 14 da mucosa do dorso da língua. As cepas foram tipadas por meio da técnica de PCR e identificadas.

#### 1.2 Seleção dos pacientes

A cada um dos indivíduos foi solicitada a participação no estudo mediante a apresentação do Termo de Consentimento Informado. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, sob registro nº 1116 (p.49). Todos os integrantes da pesquisa foram esclarecidos da natureza do estudo e questionados quanto à possibilidade de sua participação na pesquisa.

Uma ficha padronizada foi preenchida (p.50), contendo dados de identificação. Em seguida, foi realizada uma anamnese médico-odontológica para que fossem esclarecidas as condições sistêmicas dos pacientes, a história pregressa da periodontite e os medicamentos e dosagens administradas anteriores à coleta da bolsa periodontal e do dorso da língua.

Foram excluídos da amostra os indivíduos portadores de dentadura parcial ou total na maxila ou na mandíbula com sinais clínicos de candidíase bucal, com lesões de mucosa bucal;

gestantes; com desordens endócrinas; neoplasias malignas; imunodeficiências, desnutrição e aqueles que utilizaram antibióticos e/ou medicamentos relacionados à ocorrência de *Candida* spp., corticosteróides, imunossupressores ou que realizaram quimioterapia e radioterapia, num período de 3 meses anteriores à avaliação (Song et al., 2003).

O exame clínico consistiu no registro do nível de inserção clínica periodontal e a profundidade de sondagem. O nível de inserção clínica é a distância entre a junção cimento-esmalte até a posição em que a ponta da sonda que foi inserida no sulco com força moderada encontra resistência. O registro do nível de inserção clínica foi realizado pela inserção de uma sonda periodontal milimetrada tipo Williams<sup>12</sup> no sulco gengival ou na bolsa periodontal para mensurar a perda de inserção clínica até o nível apical. As medidas foram realizadas em 4 sítios ao redor de cada dente (vestibular, lingual, mesial e distal).

### 1.3 Amostras

As amostras subgengivais na PUCPR foram coletadas de indivíduos com bolsas periodontais, avaliadas clinicamente e radiograficamente pela presença de perda óssea e sangramento gengival, com no mínimo 5.0 mm de profundidade de sondagem. Todos os dentes presentes na boca foram sondados com sonda periodontal milimetrada tipo Williams<sup>13</sup>. Anteriormente à sondagem, foi realizada a profilaxia da coroa dentária para evitar a introdução artificial de cepas de *Candida* na bolsa periodontal. A profilaxia foi realizada com escovas tipo Robson tradicional e pasta profilática, ou apenas com jatos de água e bolinhas de algodão, dependendo da quantidade de biofilme presente sobre a superfície dentária. Os dentes que apresentaram bolsa maior ou igual a 5mm de profundidade foram escolhidos para a coleta. Previamente às coletas subgengivais, foi feito isolamento relativo de cada dente selecionado com roletes de algodão, com a finalidade de não haver contaminação do local por saliva. Na PUCPR foram coletadas duas amostras por indivíduo, com curetas Gracey estéreis<sup>14</sup>. Os dentes escolhidos para coleta foram submetidos à raspagem radicular e o material obtido foi, logo em seguida, transferido para tubos de ensaio contendo 1mL de solução fisiológica estéril (Hannula et al 2001). As amostras de *C. albicans* da mucosa bucal retiradas do dorso de língua foram obtidas com auxílio de *swab* de algodão estéril. A coleta dessas amostras foi realizada antes de se fazer a profilaxia dentária, com a finalidade de não

---

<sup>12</sup> Trinity®, SP, Brasil

<sup>13</sup> Trinity®, SP, Brasil

interferir nos microorganismos presentes na mucosa por meio da profilaxia. Os *swabs* de algodão contendo material coletado foram agitados em 1mL de solução fisiológica estéril, dentro de tubos de ensaio de 10mL. Logo em seguida os *swabs* foram descartados. Os tubos contendo as amostras foram agitados e logo em seguida as soluções foram semeadas sobre a superfície do meio de cultivo diferencial CHROMagar *Candida*<sup>15</sup>, com ajuda de um *swab* de algodão estéril (Willinger & Manafi, 1999).

Na FOP-UNICAMP as amostras (seis sítios por indivíduo) foram coletadas com cones de papel absorvente esterilizados<sup>16</sup>, nas bolsas periodontais com profundidade de sondagem acima de 3mm, com presença de sangramento e supuração. Previamente às coletas subgingivais, foi feito isolamento relativo de cada dente selecionado com roletes de algodão, e o biofilme supragengival foi removido por curetas, bolinhas de algodão e fio dental. Para evitar a contaminação pela microbiota salivar foram feitas a sucção da saliva e a secagem do dente com jatos de ar. As amostras de *C. albicans* da mucosa bucal retiradas do dorso de língua foram obtidas com auxílio de *swab* de algodão estéril. As amostras obtidas na FOP-UNICAMP foram identificadas, submetidas á análise por PCR específico a fim de confirmar suas identidades, armazenadas em tubos de cultura e conduzidas ao laboratório de Estomatologia da PUCPR para inclusão no presente estudo.

---

<sup>14</sup> Trinity®, SP, Brasil

<sup>15</sup> CHROMagar Microbiology, BioMeriux, Paris, France

<sup>16</sup> 35-55, Endopoints Industria e Comércio Ltda., Paraíba do Sul, RJ. Brasil

#### 1.4 Identificação preliminar das amostras

As amostras dos sítios subgingivais e de mucosa bucal contidas nos microtubos (1mL) obtidas na PUCPR, foram semeadas sobre meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*<sup>17</sup>, incubadas a 37°C por 48 horas (figura 1). Tomou-se o cuidado de se escolher apenas uma cepa de *C.albicans* procedente de bolsa periodontal de cada paciente atendido na PUCPR. Esse procedimento foi importante para que não houvesse repetições de cepas de *C.albicans* de linhagens iguais durante os testes.

Todos as leveduras identificadas como sendo *C. albicans*, foram incubadas a 30°C em Ágar Sabouraud Dextrose<sup>18</sup> (Sandven, 1990) e armazenados em tubos de cultura, mantidos sob refrigeração. A amostras enviadas da FOP-UNICAMP foram reativadas em Ágar Sabouraud Dextrose e armazenadas sob refrigeração juntamente com as obtidas na PUCPR.

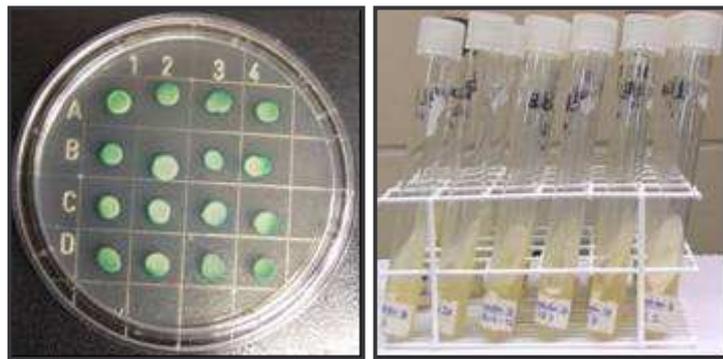


Figura 1. Placa de CHROMagar com cepas de *C.albicans* e isolados armazenados em Ágar Saboraud.

#### 1.5 Meio de cultura

O meio de cultura GPP, descrito por Dumitru *et al.* (2004) foi modificado e utilizado para simular o ambiente subgingival *in vitro*. O GPP é um meio de cultura para fungos e contém (por 900 mL de água destilada): 4,0g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,2 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1,2 g de L-prolina, e 0,7g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . A L-prolina foi substituída por 0,5g de L-lisina<sup>19</sup> e 1,0g de extrato de levedura<sup>20</sup>. Depois de autoclavado o meio, 40 mL com 20% (wt/vol) glucose anidra

<sup>17</sup> CHROMagar Microbiology, BioMeriux, Paris, France

<sup>18</sup> Himedia Laboratories Ltd, Mumbai, Índia

<sup>19</sup> Henrifarma Prods. Quims e Farms. Ltda

<sup>20</sup> Biobrás SA , Ind. Brasileira

PA<sup>21</sup>, 0,5 mL de uma mistura de vitaminas e minerais Centrum<sup>22</sup> foram adicionados. A mistura de vitaminas contém (20% de etanol por 100mL): 2g de biotina, 20mg de tiamina-HCl e 20mg de piridoxidina-HCl. A mistura de minerais contém (0,1N HCl por 100mL): 0,5g de CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O, 0,5 g de ZnSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O, 0,8 g de MnCl<sub>2</sub>. 4H<sub>2</sub>O e 0,5 g de FeSO<sub>4</sub>. As misturas de vitaminas e minerais foram filtradas em filtro estéril de nitrato de celulose de microporo 0,22µm<sup>23</sup>. Para crescimento anaeróbico de *C. albicans*, o meio GPP foi suplementado com 200µl de 1mM de ácido oléico em 100% de metanol, 200µl de 4mM de ácido nicotínico e 1mL de 500mM NH<sub>4</sub>Cl. O pH definido para crescimento foi 5,0. O meio GPP modificado foi armazenado em *freezer* (-20°C), em placas de microdiluição de 96 poços<sup>24</sup>, sendo que 100µl de meio foi depositado em cada poço.

## 1.6 Preparo do inóculo aeróbico

As amostras de *C. albicans* armazenadas em Ágar Sabouraud Dextrose<sup>25</sup>, foram repicadas em tubos de ensaio contendo 3mL de Caldo Sabouraud Dextrosado<sup>26</sup> esterelizados. As amostras foram transferidas para o Caldo Sabouraud utilizando-se palitos de madeira estéreis. A inoculação do novo meio foi feita em fluxo laminar, para evitar qualquer tipo de contaminação (figura 2). Logo após a inoculação, a cultura foi incubada a 35°C, pelo período de 24 horas foi usado para preparo aeróbico de *C. albicans*. Após o crescimento as células foram colhidas e lavadas três vezes em água deionizada esterelizada. A lavagem foi feita da seguinte maneira: após crescimento de 24 horas, a cultura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos para que as células se depositassem no fundo dos tubos. O meio líquido foi descartado e 3mL de água deionizada estéril foi acrescentada sobre as células depositadas. A cultura foi agitada em agitador mecânico de tubos de ensaio, modelo Vórtex e novamente centrifugada. O procedimento foi repetido por 3 vezes.

Após a lavagem, a densidade celular das soluções celulares foram suspensas de acordo com a escala n° 5 de Mc Farland, acrescentando-se água deionizada estéril em cada tubo até chegar à turvação adequada. A escala n° 5 de Mc Farland corresponde a densidade celular de  $2 \times 10^7$  células por mL de solução. As células foram armazenadas à 4°C.

<sup>21</sup> Vetec Química Fina Ltda., Ind. Brasileira

<sup>22</sup> Wyeth-Ayerst Canada Inc., Montrel, Canadá

<sup>23</sup> Whatman, Maidstone, United Kingdom

<sup>24</sup> Difco, Detroit, USA

<sup>25</sup> Himedia Laboratories Ltd, Mumbai, Índia

<sup>26</sup> Biobrás SA, Ind. Brasileira.



Figura 2. Centrífuga e Vórtex, no procedimento de lavagem das células.

### 1.7 Preparo do inóculo anaeróbio

As amostras de *C. albicans* armazenadas em Ágar Sabouraud Dextrose<sup>27</sup>, foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 3mL de GPP modificado esterelizados. As amostras foram transferidas para o Caldo GPP modificado utilizando-se palitos de madeira estéreis. A inoculação do novo meio foi feita em fluxo laminar, para evitar qualquer tipo de contaminação. A cultura foi incubada anaerobicamente em jarra GasPak com dispositivo Anaerobac<sup>28</sup> a 35°C, por 48 horas (figura 3). Após o crescimento, as células foram reinoculadas em 3mL de meio de cultura GPP modificado estéril e, novamente, incubadas em ambiente anaeróbio, na temperatura de 35°C, durante outras 48 horas. Este procedimento visa tornar as células totalmente adaptadas às condições de anaerobiose. Após o crescimento, as células foram colhidas e lavadas 3 vezes em água deionizada esterelizada. Seguindo o mesmo método usado para a cultura em aerobiose. Após a lavagem, as soluções celulares foram suspensas até  $2 \times 10^7$  células/mL e armazenadas à 4°C.

<sup>27</sup> Himedia Laboratories Ltd, Mumbai, India

<sup>28</sup> Probac do Brasil, Produtos bacteriológicos Ltda.

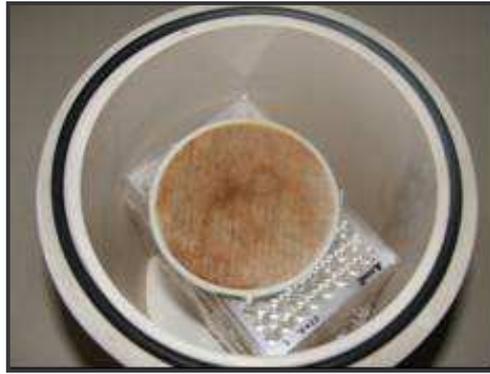


Figura 3. Jarra contendo Anaerobac e placas de cultura.

### 1.8 Suscetibilidade antifúngica

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima de cada uma das drogas usadas neste estudo (tetraciclina<sup>29</sup>, metronidazol<sup>30</sup> e digluconato de clorexidina<sup>31</sup>), foi usada a técnica de microdiluição em caldo. A tetraciclina e o metronidazol na forma de pó, e o digluconato de clorexidina à 20% em solução. As drogas em pó foram pesadas de acordo com a concentração desejada e diluídas em 5mL de GPP modificado. Em seguida foram filtradas através de filtros estéreis de nitrato de celulose Whatman de microporo 0,22 $\mu$ m<sup>32</sup>. O digluconato de clorexidina a 20% foi diluído em meio GPP modificado até se obter a concentração desejada e a solução filtrada em filtro estéril de nitrato de celulose Whatman de microporo 0,22 $\mu$ m. Todas as drogas foram transferidas para as placas de microdiluição de 96 poços<sup>33</sup>, contendo 100 $\mu$ L de meio de cultura GPP modificado em cada poço, de forma a se obter uma escala com doze poços com concentração decrescente (metronidazol 6400 - 3,125  $\mu$ g/mL, clorexidina 4800 - 2,34  $\mu$ g/mL e tetraciclina 400 - 0,195  $\mu$ g/mL). As drogas foram transferidas para os poços com ajuda de uma pipeta automatizada Eppendorf de 8 pontas, contendo 8 ponteiras de 200  $\mu$ L. Sendo que 100 $\mu$ L de cada medicamento, na sua maior concentração, foi acrescentado ao primeiro poço da placa de microdiluição. Com auxílio da pipeta, a solução foi homogeneizada e 100 $\mu$ L da solução resultante foi retirada e descartada no segundo poço. Essa segunda solução foi novamente homogeneizada e 100 $\mu$ L retirados para transferência para o terceiro poço e assim sucessivamente, até completar a microdiluição

<sup>29</sup> Genix Ind. Farmacêutica Ltda, Brasil

<sup>30</sup> Purifarma Distribuidora Química Farmacêutica Ltda, Brasil

<sup>31</sup> Pharma Nostra Comercial Ltda, Brasil

<sup>32</sup> Whatman, Maidstone, United Kingdom

nos doze poços da placa. Obtendo-se sempre a metade da concentração colocada no poço anterior.

Cada poço contendo 100µL de solução GPP adicionada a droga, foi inoculado com 10µL suspensão de *C. albicans*, de forma que a densidade celular final dentro de cada poço foi de  $10^6$  cels/mL, devido a diluição do inóculo no meio de cultura. Teve-se o cuidado de inocular as culturas aeróbias em placas com meio de cultura aeróbio, e culturas anaeróbias em meio de cultura preparado para anaerobiose. As placas de microdiluição inoculadas, foram incubadas a 35°C, em atmosferas aeróbia e anaeróbia (GasPak com Anaerobac<sup>34</sup>). O crescimento foi monitorado por 24 a 48 horas (aeróbio) ou 72 horas (anaeróbio). A quantidade de crescimento nos diferentes poços contendo o agente antimicrobiano foi comparada, visualmente, com a quantidade de crescimento no poço controle (sem agente) usado em cada série de testes. A leitura dos resultados foi realizada por um único examinador treinado e calibrado. Nos poços em que houve crescimento celular, o meio de cultura tornou-se turvo e nos poços onde houve inibição de crescimento celular o meio permaneceu límpido. Sendo que a concentração inibitória mínima do medicamento é a concentração encontrada no primeiro poço em que não houve crescimento celular, como indica a figura 5.



Figura 4. Inoculação de cepas em placas 96 poços, contendo meio de cultura e medicamentos em diluição de 12x

<sup>33</sup> Difco, Detroit, USA

<sup>34</sup> Probac do Brasil, Produtos Bacteriológicos Ltda.



Figura 5. Leitura das placas de cultura. Placa apresentando algum crescimento, a partir da seta azul. A seta vermelha indica o poço com maior concentração do fármaco.

## REFERÊNCIAS REFERENTES A MATERIAIS E MÉTODOS:

1. Armitage G. Development of classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999; 4:1-6.
2. Dumitru R, Hornby JM, Nickerson KW. Defined anaerobic growth medium for studying *Candida albicans* basic biology and resistance to eight antifungal drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2350–2354.
3. Hannula J, Saarela M, Alaluusua S, Slots J, Asikainen S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:358-365.
4. Sandven P. Laboratory identification and sensitivity testing yeast isolates. *Acta Odont Scand* 1990; 48: 27-36.
5. Song X, Sun J, Hansen BF, Olsen I. Oral distribution of genera, species and biotypes of yeasts in patients with marginal periodontitis. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1999; 42: 61-65.
6. Wiebe CB, Putnins EE. The periodontal disease classification system of the american academy of periodontology – An update. *J Can Dent Assoc* 2000; 66:594-597.
7. Willinger B, Manafi M. Evaluation of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida* species. *Mycoses* 2003;15: 114-119.

## 2. Anexo II – Análise estatística

Os testes de Kolmogorov-Smirnov e Levene testaram a normalidade e homogeneidade das variáveis estudadas.

O teste não-paramétrico U de Mann-Whitney ( $P < 0.05$ ) foi usado para comparar o efeito dos antimicrobianos sobre o crescimento da *C. albicans* proveniente de mucosa bucal e bolsa periodontal em aerobiose e anaerobiose.

**PLANILHA REFERENTE AOS DADOS OBTIDOS:**

Cepas	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	Aerobiose			Anaerobiose		
<i>C.albicans</i>	Metronidazol	Tetraciclina	Clorexidina	Metronidazol	Tetraciclina	Clorexidina
PP1	>6400	>400	1200	>6400	>400	9,37
PP2	>6400	>400	1200	>6400	>400	2,34
PP3	>6400	>400	1200	>6400	>400	18,7
PP4	>6400	>400	1200	>6400	>400	2,34
PP5	>6400	>400	1200	>6400	>400	2,34
PP6	>6400	>400	1200	>6400	>400	18,7
PP7	>6400	>400	1200	>6400	>400	2,34
PP8	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
PP9	>6400	>400	37,5	>6400	>400	18,7
PP10	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
PP11	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
PP12	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
PP13	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
PP14	>6400	>400	150	>6400	>400	2,34
PP15	>6400	>400	150	>6400	>400	9,37
PP16	>6400	>400	150	>6400	>400	2,34
TD1	>6400	>400	1200	>6400	>400	18,7
TD2	>6400	>400	600	>6400	>400	2,34
TD3	>6400	>400	1200	>6400	>400	18,7
TD4	>6400	>400	1200	>6400	>400	18,7
TD5	>6400	>400	1200	>6400	>400	2,34
TD6	>6400	>400	1200	>6400	>400	18,7
TD7	>6400	>400	1200	>6400	>400	18,7
TD8	>6400	>400	1200	>6400	>400	2,34
TD9	>6400	>400	1200	>6400	>400	9,37
TD10	>6400	>400	150	>6400	>400	9,37
TD11	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
TD12	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
TD13	>6400	>400	600	>6400	>400	37,5
TD14	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
TD15	>6400	>400	150	>6400	>400	2,34
TD16	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
TD17	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
TD18	>6400	>400	37,5	>6400	>400	2,34
TD19	>6400	>400	150	>6400	>400	2,34
TD20	>6400	>400	37,5	>6400	>400	9,37

PP: cepas isoladas de bolsa periodontal

TD: cepas isoladas de mucosa bucal

### 3. Anexo III - Termo de Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Pró-Reitoria Acadêmica e de Pesquisa  
Núcleo de Bioética

Curitiba, 28 de junho de 2006.

Of. 289/06/CEP-PUCPR

Ref. "Determinação das concentrações inibitórias mínimas de diversos agentes antimicrobianos em anaerobiose, frente a CEPAS de candida albicans Isoladas de bolsas periodontais"

Prezado (a) Pesquisador (es),

Venho por meio deste informar a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, no dia 28 de junho do corrente ano **aprovou** o Projeto Intitulado "Determinação das concentrações inibitórias mínimas de diversos agentes antimicrobianos em anaerobiose, frente a CEPAS de candida albicans Isoladas de bolsas periodontais", pertencente ao Grupo III, sob o registro no CEP n° 1116, e será encaminhado a CONEP para o devido cadastro. Lembro ao senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final a este CEP.

Atenciosamente,

Profª M. Sc Ana Cristina Miguez Ribeiro  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa - PUCPR

Ilma Sra  
Andressa Marafon Semprebom

#### 4. Anexo IV - Ficha Clínica

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ n.º: \_\_\_\_\_ Apto: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Data Exame: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

##### Exame Físico Geral

##### História Médica

01 - Está em tratamento médico? \_\_\_\_\_

02 - Nome do Médico \_\_\_\_\_

End: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_

04 - Faz uso de algum medicamento? \_\_\_\_\_

05 - Qual (is) os medicamentos e qual (is) são as dosagens, a quanto tempo?

\_\_\_\_\_

Você ou alguém de sua família tem ou teve qualquer uma destas doenças?

- |  |                                   |  |
|--|-----------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Febre reumática                 | <input type="checkbox"/> Asma     | <input type="checkbox"/> Distúrbios Sanguíneos   |
| <input type="checkbox"/> Diabetes                        | <input type="checkbox"/> Sinusite | <input type="checkbox"/> Tuberculose             |
| <input type="checkbox"/> Doença Cardíaca                 | <input type="checkbox"/> Alergia  | <input type="checkbox"/> Desmaios ou Convulsão   |
| <input type="checkbox"/> Dist. Renais                    | <input type="checkbox"/> Artrite  | <input type="checkbox"/> Hipertensão Arterial    |
| <input type="checkbox"/> Dist. Hepáticos                 | <input type="checkbox"/> Aids     | <input type="checkbox"/> Dist. Gastrointestinais |
| <input type="checkbox"/> Dist. Ouidos, Nariz ou Garganta | <input type="checkbox"/> Anemia   | <input type="checkbox"/> Outros                  |

Já sofreu alguma cirurgia ou esteve hospitalizado? \_\_\_\_\_

Quando? \_\_\_\_\_ Por que? \_\_\_\_\_

Tempo de sangramento: \_\_\_\_\_ Cicatrização: \_\_\_\_\_

Pressão Arterial \_\_\_/\_\_\_ mm Hg Batimentos cardíacos: \_\_\_ por min.

Hábitos  Fumo  Álcool  Orais  Dieta

##### História Odontológica:

Último tratamento dentário: \_\_\_\_\_ Por que? \_\_\_\_\_

Já tomou anestesia? \_\_\_\_\_ Teve reação? \_\_\_\_\_

## 5. Anexo V – Termo de consentimento livre e informado

Título do projeto: AUMENTO DA SUSCETIBILIDADE DE *Candida albicans* À CLOREXIDINA EM CONDIÇÕES DE ANAEROBIOSE

**INVESTIGADOR:** Cirurgiã Dentista Andressa Marafon Semprebom

Endereço: Pontifícia Universidade Católica do Paraná – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Curso de Odontologia - Rua Imaculada Conceição 1155, CEP 80215-901, Curitiba – PR

### INTRODUÇÃO

O pesquisador que conduz este projeto determinou que você atende aos requisitos iniciais para a participação no estudo. As informações a seguir descrevem o estudo e qual vai ser o seu papel como participante do estudo. O pesquisador ou membro da equipe explicará os procedimentos e responderá a qualquer pergunta que você possa ter sobre este termo de consentimento informado e/ou sobre o estudo. Leia cuidadosamente este documento e não hesite em fazer perguntas sobre o alvo do estudo ou sobre as informações fornecidas abaixo que você não entenda plenamente. Nenhuma garantia pode ser feita quanto aos resultados do estudo.

### FINALIDADE DO ESTUDO

Com base na relativa falta de informações sobre a atuação de fármacos utilizados no tratamento periodontal e sua ação sobre *C. albicans* em bolsas periodontais, este estudo avaliou a suscetibilidade da levedura frente à tetraciclina, metronidazol e digluconato de clorexidina, em condições de aerobiose e de anaerobiose.

### DESCRIÇÃO DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS

Cada indivíduo será contatado e questionado quanto a possibilidade de sua participação neste trabalho. Uma vez aceito, será preenchida uma ficha padronizada contendo dados pessoais, informações sobre o estado de saúde geral, tabagismo, tempo transcorrido após o último tratamento periodontal e medicações. Será diagnosticada a doença periodontal e será anotado o índice de placa, o índice gengival e o nível de inserção clínica. A avaliação da doença periodontal é simples, consiste em inserir uma sonda periodontal milimetrada entre a gengiva e o dente para obter registros da presença da doença. Após a sondagem, os dentes que apresentarem bolsa periodontal com nível de inserção clínica maior ou igual a 5mm terão sua superfície limpa com uma “escova de Robson” e pasta profilática. Em seguida estes locais serão anestesiados, se necessário, e raspados com uma cureta periodontal estéril. Será também realizada a coleta de material no dorso de língua, com *swab* estéril de algodão.

### DESCONFORTO E RISCOS

De acordo com a metodologia exposta anteriormente acreditamos que o exame empregado neste estudo não seja capaz de produzir qualquer dano ou risco aos pacientes examinados. No exame periodontal pode existir algum desconforto na inserção da sonda periodontal entre a gengiva e o dente, mas este procedimento é realizado rotineiramente na prática odontológica, não necessitando de anestesia ou medicação prévia. Para a raspagem da bolsa periodontal os pacientes serão anestesiados, se necessário.

## PERGUNTAS RELACIONADAS A ESTE ESTUDO

Você tem o direito de fazer perguntas com relação a este estudo a qualquer momento. Caso tenha novas perguntas, você poderá entrar em contato com Andressa Marafon Semprebom, no telefone 041- 2711637

## PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA E DIRITO DE RECUSA/AFASTAMENTO

Sua participação neste estudo é voluntária e não remunerada. Você poderá se recusar a participar ou poderá descontinuar sua participação a qualquer momento durante o estudo, sem penalidades ou perda de benefícios.

## CONFIDENCIALIDADE

Os registros de sua participação neste estudo serão mantidos tão confidenciais quanto possível de acordo com as leis municipais, estaduais e federais. O pesquisador e o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEP-PUC-PR) poderão inspecionar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. O CEP é um comitê que revisa os estudos para ajudar a assegurar que os direitos e bem estar dos pacientes e voluntários sejam protegidos e que o estudo seja conduzido eticamente.

Qualquer publicação dos dados não o identificará. Assinando este formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a utilizar os dados obtidos, sem contudo citar seu nome.

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado (a) dos objetivos específicos desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram respondidas com clareza e sei que poderei solicitar novos esclarecimentos a qualquer momento. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo, me serão fornecidas e que terei liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim o desejar.

Fui informado que caso existam danos à minha saúde, causados diretamente pela pesquisa, terei direito a tratamento médico e indenização conforme estabelece a lei. Também sei que, caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Autorizo a liberação dos registros médicos-odontológicos ao pesquisador e ao Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (CEP-PUCPR).

Declaro ainda que recebi cópia do presente Termo de Consentimento

\_\_\_\_\_  
Assinatura da paciente                      Nome    (Local, Data e Hora)

\_\_\_\_\_  
Assinatura do pesquisador                      Nome    (Local, Data e Hora)

Este formulário foi lido para \_\_\_\_\_ (nome da paciente)

em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ pelo \_\_\_\_\_ (nome do pesquisador)

enquanto eu estava presente.

\_\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha                      Nome    Data

## 6. Anexo VI - Normas para Publicação no Journal of Periodontal Research

### Manuscripts:

**Electronic submission:** Authors must submit their manuscripts electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/jre>, Author Center. Complete instructions for preparing and submitting manuscripts online are provided at the submission site.

Authors are notified promptly by e-mail that their manuscripts have been received.

Additional pages will be charged to the author(s) at the rate of GBP70 per page.

The article should be clearly divided as follows:

**Title page** - should contain the title of the article, name(s) of the author(s), initials, and institutional affiliation(s), a running title not to exceed 40 letters and spaces, and the name and complete mailing address, including email address, of the author responsible for correspondence. The author must list 4 keywords for indexing purposes.

**Abstract** - A separate abstract should *not exceed 250 words*. The abstract should consist of 1) the objective 2) the background data discussing the present status of the field 3) methods 4) results 5) conclusion.

**Introduction** - Summarize the rationale and purpose of the study, giving only strictly pertinent references. Do not review existing literature extensively.

**Material and methods** - Materials and methods should be presented in sufficient detail to allow confirmation of the observations. Published methods should be referenced and discussed only briefly, unless modifications have been made.

**Results** - Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all of the data in the tables and illustrations. Important observations should be emphasized.

**Discussion** - Summarize the findings without repeating in detail the data given in the Results section. Relate your observations to other relevant studies and point out the implications of the findings and their limitations. Cite other relevant studies.

**Acknowledgements** - Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. Sources of financial support may be acknowledged.

**Short communication.** Short communications, limited to one printed page, including illustrations and references, will be considered for rapid publication. Such papers must be based on work that is of special importance or having the potential for great impact, or a body of work that is complete but of insufficient scope to warrant a fulllength paper. Short communications need not follow the usual divisions.

**References** - References should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text, and should be kept to a pertinent minimum. References should include the beginning and ending page numbers. Identify references in the text, tables, and figure legends by arabic numerals in parentheses. References cited only in the tables or figure legends should

be numbered in accordance with a sequence established by the first notation of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which is based on *Index Medicus*. Manuscripts accepted but not published may be cited in the reference list by placing "in press" after the abbreviated title of the journal. Abstracts and manuscripts not yet accepted may be cited in full in the text but not in the reference list. References must be verified by the author(s) against the original documents.

### Examples:

#### (1) *Standard journal article*

(List all authors up to 6; for 7 or more list the first 3 and add "et al.") Dockrell H, Greenspan JS. Histochemical identification of T- cells in oral lichen planus. *Oral Surg* 1979; **48**: 42-49. Thomas Y, Sosman J, Yrigoyen O, et al. Functional analysis of human T- cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B-cell differentiation. *J Immunol* 1980; **125**: 2402-2405.

#### (2) *Corporate author*

The Royal Marsden Hospital Bone- Marrow Transplantation Team. Failure of syngeneic bone- marrow graft without preconditioning in post- hepatitis marrow aplasia. *Lancet* 1977; **2**: 628-630.

#### (3) *No author given*

Anonymous. Coffee drinking and cancer of the pancreas [Editorial]. *Br Med J* 1981; **283**: 628-635.

#### (4) *Journal supplement*

Mastri AR. Neuropathology of diabetic neurogenic bladder. *Ann Intern Med* 1980; **92** (2 pt 2): 316- 324.

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979; **54** (suppl 1): 26- 28.

#### (5) *Journal paginated by issue*

Seaman WB. The case of the pancreatic pseudocyst. *Hosp Pract* 1981; **16** (Sep): 24-29.

#### (6) *Personal author(s)*

Eisen HN. *Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response* , 5th edn. New York: Harper Row, 1984:406-420.

#### (7) *Editor, compiler, chairman as author*

Dausset J, Colombani J, eds. *Histocompatibility testing 1972*. Copenhagen: Munksgaard, 1973: 12-18.

#### (8) *Chapter in a book*

Weinstein L, Swartz MN. Pathogenic properties of invading microorganisms. In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, eds. *Pathologic physiology: mechanisms of disease* . Philadelphia: WB Saunders, 1974: 457-480.

#### (9) *Published proceedings paper*

DePont B. Bone marrow transplantation in severe combined immunodeficiency with an unrelated MLC compatible donor. In: White HJ, Smith R, eds. *Proceedings of 3rd Annual Meeting of the International Society for Experimental Hematology*. Houston: International Society for Experimental Hematology, 1974: 44-50.

(10) *Agency publication*

Ranofsky AL. Surgical operations in short-stay hospitals: United States - 1975. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics, 1978; DHEW publication no. (PHS) 78-1785. (Vital and health statistics; series 13; no. 34.)

(11) *Dissertation or thesis*

Cairns RB. Infrared spectroscopic studies of solid oxygen. Berkeley, CA: University of California, 1965. 156pp. Dissertation.

**Illustrations** - All figures should clarify the text and their number should be kept to a minimum. Details must be large enough to retain their clarity after reduction in size. Illustrations should preferably fill a single column width (54 mm) after reduction, although in some cases 113 mm (double column) and 171 mm (full page) widths will be accepted. Micrographs should be designed to be reproduced without reduction, and they should be dressed directly on the micrograph with a linear size scale, arrows, and other designators as needed. Submit at least one original set of illustrations, identifying each with a label on the back which indicates the number, author's name, and the top. Alternatively, arrange micrographs into plates fitting the space appropriately. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast.

**Tables** - Tables should be numbered consecutively with arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page.

**Scientific names.** Proper names of bacteria should be binomial and should be singly underlined in the typescript. The full proper name (e. g. *Streptococcus sanguis* ) must be given upon first mention. The generic name may be abbreviated thereafter with the first letter of the genus (e. g. *S. sanguis* ). If abbreviation of the generic name could cause confusion, the full name should be used. If the vernacular form of a genus name (e. g. streptococci) is used, the first letter of the vernacular name is not capitalized and the name is not underlined. Use of two letters of the genus (e. g. *Ps.* for *Peptostreptococcus* ) is incorrect, even though it might avoid ambiguity. With regard to drugs, generic names should be used instead of proprietary names. If a proprietary name is used, A must be attached when the term is first used.

**Abbreviations and symbols** The symbol % is to be used for percent, h for hour, min for minute, and s for second. *In vitro* and *in vivo* are to be italicized. Use only standard abbreviations. All units will be metric. Use **no roman** numerals in the text. In decimals, a decimal point and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. In cases of doubt, the spelling orthodoxy of *Webster 's Third New International Dictionary* will be adhered to.

**Author material archive policy** - Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two months after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.

**Offprints** - A PDF offprint will be supplied to the corresponding author. Additional offprints may be ordered on the form accompanying the proofs.

**NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services.**

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit [www.blackwellpublishing.com/bauthor](http://www.blackwellpublishing.com/bauthor) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.