
CONTAGEM E IDENTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS

NA SALIVA DE PORTADORES DO VÍRUS

DA IMUNODEFICIÊNCIA HUMANA ANTES E APÓS

HIGIENIZAÇÃO E BOCHECHO COM ANTI-SÉPTICOS

Cristyane Gonçalves Benicio Bastos Rocha, ¹ Cleomenes Reis ² e Fabiana Cristina Pimenta ²

RESUMO

Infecções da mucosa bucal estão provavelmente relacionadas com a soropositividade para o HIV, bem como alterações no número e nas espécies microbianas. O presente estudo buscou identificar e quantificar os microrganismos na saliva de 56 adultos portadores do HIV, antes e após higienização e bochecho com os anti-sépticos Periogard[®] e Cepacol[®], e determinar a concentração inibitória mínima (CIM) desses anti-sépticos. Foram coletadas duas amostras de saliva não estimulada de cada paciente. A primeira coleta foi realizada antes de qualquer intervenção; a segunda, após instruções e práticas de higiene bucal e bochecho com Periogard[®] ou Cepacol[®]. A determinação da CIM foi realizada pelo método de diluição em ágar. Foram isolados 54 leveduras, 43 bastonetes Gram negativos (BGN), 42 estafilococos e 29 estreptococos do grupo mutans (EGM). As contagens microbianas, após higienização e bochecho, sofreram uma redução significativa para ambos os anti-sépticos. Considerando o Periogard[®], a redução foi de 5 logs para EGM, de 4 logs para estafilococos e BGN e de 2 logs para as leveduras. O Cepacol[®] promoveu uma redução de 5 logs para EGM, de 4 logs para os estafilococos, de 3 logs para BGN e de 1 log para as leveduras. A CIM para os EGM variou de 0,06 a 0,48µg/mL para o Periogard[®] e 0,05 a 0,2µg/mL para o Cepacol[®]; estafilococos de 0,0002344 a 0,0009375µg/mL para o Periogard[®] e 0,003125 a 0,1µg/mL para o Cepacol[®]; bastonetes Gram negativos de 0,001875 a 0,12µg/mL para o Periogard[®] e 0,0125 a 0,2µg/mL para o Cepacol[®] e leveduras de 0,0075 a 0,06µg/mL para o Periogard[®] e 0,003125 a 0,025µg/mL para o Cepacol[®]. Os indivíduos portadores do HIV apresentaram elevada prevalência de *C. albicans* na saliva. É preocupante a presença de estafilococos e enterobactérias na saliva destes pacientes imunodeprimidos, uma vez que são patógenos virulentos com capacidade de disseminação. O uso de anti-sépticos associados a uma higienização supervisionada reduz significativamente a carga microbiana destes indivíduos, o que torna a associação recomendada.

DESCRITORES: Microrganismos. Saliva. Anti-sépticos. Portadores do HIV.

1 Mestre em Microbiologia, Programa de Mestrado em Medicina Tropical, Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia (DMIPP), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás (UFG).

2 Professores Doutores, DMIPP, IPTSP, UFG.

Endereço para correspondência: Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, rua Delenda Rezende Melo, s/n , Setor Universitário. CEP: 74605-050, Goiânia, Goiás, Brasil.

Recebido para publicação em 23/11/2005. Revisto em 27/8/2006. Aceito em 5/9/2006.

INTRODUÇÃO

As infecções bucais ocorrem como os primeiros sinais de manifestação do HIV ou até mesmo da AIDS (Brasil, 1996) e, normalmente, essas infecções são causadas por membros da própria microbiota do hospedeiro. A microbiota bucal de indivíduos imunocompetentes é diferente da microbiota de pacientes HIV positivos, uma vez que se observam alterações no número e nas espécies microbianas (Coleman et al., 1993). A persistência ou recorrência de infecções na boca pode refletir resistência à terapêutica ou progressão de doença generalizada (Magalhães, 1996).

Streptococcus mutans e *S. sobrinus* são os agentes microbianos mais importantes na etiologia da cárie dentária, em consequência de sua capacidade de aderência e colonização dos dentes. Pessoas infectadas pelo HIV apresentam sistema imunológico suprimido e xerostomia, fatores estes que aumentam, consideravelmente, o risco de cárie (Madigan et al., 1996).

Staphylococcus aureus é causa comum de infecções em pacientes infectados pelo HIV. Senthilkumar et al. (2001) estudaram 53 pacientes do sexo masculino que apresentaram 57 episódios de bacteremia por *S. aureus*. A incidência por 1.000 pacientes hospitalizados foi de 13,2 entre os HIV positivos e 0,8 entre HIV negativos.

Schimid-Westhausen et al. (1990) detectaram a presença de enterobactérias em raspados bucais de 5% dos pacientes HIV positivos. Manfredi et al. (2001), em um estudo retrospectivo com dados clínicos e laboratoriais de 2.517 pacientes HIV positivos hospitalizados, observaram episódios de infecção por *Enterobacter* spp que apresentavam uma elevada virulência, o que, conseqüentemente, complicava o curso da doença.

Candida albicans é um microrganismo oportunista que infecta, primariamente, o hospedeiro imunocomprometido, sendo a *C. albicans* a espécie mais comumente isolada (Fridkin et al., 1996). A candidíase bucal é uma das mais importantes infecções oportunistas e acomete mais de 90% dos pacientes infectados pelo HIV (Korting et al., 1999). Em recentes estudos têm sido descritas mudanças na população de *Candida* na microbiota em pacientes infectados pelo HIV, como a emergência de *Candidas* não *albicans* (Nguyen et al., 1998). Essas mudanças têm sido particularmente associadas ao uso de agentes antifúngicos, como o fluconazol (Ghannoum & Rice, 1999).

Os recursos mecânicos, como escovação e uso do fio dental, devem ser utilizados diariamente, porém muitas vezes não são executados adequadamente. Por isso, diversas substâncias têm sido utilizadas para o controle químico do biofilme dentário, como adjuvantes aos procedimentos mecânicos (Devore, 1994).

A clorexidina, princípio ativo do Periogard®, tem se mostrado eficiente no controle químico do biofilme dentário. É uma bisguanidina catiônica com atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas, Gram negativas e leveduras, que reduz a formação do biofilme (Ouhayoun, 2003). O cloreto de cetilpiridínio presente

no Cepacol® causa danos à membrana celular bacteriana, levando a uma perda da organização estrutural (Sreenivasan et al., 2002).

Este trabalho objetivou isolar, quantificar e identificar os microrganismos presentes na saliva de adultos portadores do HIV antes e após higienização e bochecho com os anti-sépticos Periogard® e Cepacol®, bem como determinar a concentração inibitória mínima de ambos. A escolha desses anti-sépticos deveu-se ao fato de serem agentes indicados e utilizados na prática odontológica (Anderson, Calder & Thomas, 2000).

MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudados 56 indivíduos portadores do HIV, atendidos no consultório odontológico do Hospital de Doenças Tropicais (HDT) Anuar Auad em Goiânia, Goiás, no período de agosto a dezembro de 2003. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética do HDT e os pacientes foram orientados sobre a pesquisa. Aqueles que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

Foram coletadas, em tubos esterilizados, duas amostras de saliva não estimulada (2,0 mL) de cada paciente, entre os selecionados aleatoriamente. A primeira coleta de saliva foi realizada antes de qualquer intervenção do profissional. A segunda foi realizada após instruções de higiene bucal, realização de escovação supervisionada, uso de fio dental e bochecho por um minuto com Periogard® ou Cepacol®.

As amostras foram transportadas em caixas de isopor sem gelo para o Laboratório de Bacteriologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública. A saliva foi homogeneizada em vortex, por um minuto, e submetida a uma diluição decimal seriada em tampão fosfato de sódio (PBS) e 50µL semeados pela técnica de gota (Westergren & Krasse, 1978): em ágar SB20 (Davey & Rogers 1984; Torres 1991) para isolamento de EGM; em ágar manitol para estafilococos; em ágar MacConkey para bastonetes Gram negativos e em ágar Sabouraud para a detecção de leveduras (Koneman et al., 2001).

A caracterização macroscópica e a contagem das unidades formadoras de colônias (ufc) foram realizadas sob luz refletida com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Posteriormente foram realizadas provas bioquímicas para a identificação das espécies (Koneman et al., 2001).

Os microrganismos isolados também foram submetidos ao teste de suscetibilidade *in vitro* ao Periogard® (Colgate-Palmolive Ltda, São Paulo), com gluconato de clorexidina a 0,12%, e ao Cepacol® (Merrel Lepetit Farmacêutica e Industrial Ltda, São Paulo), contendo 0,05µg/mL de cloreto de cetilpiridínio. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método de diluição em ágar, recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2004). Foram preparadas diferentes diluições seriadas dos anti-sépticos. O Periogard® foi avaliado em concentrações que variaram de 0,06 a 0,48µg/mL para

estreptococos do grupo mutans (EGM), de 0,00023344 a 0,0009375µg/mL para estafilococos, de 0,001875 a 0,12µg/mL para bastonetes Gram negativos (BGN) e de 0,0075 a 0,06µg/mL para leveduras. O Cepacol® foi avaliado em concentrações que variaram de 0,05 a 0,2µg/mL para EGM, de 0,003125 a 0,1µg/mL para estafilococos, de 0,0125 a 0,2µg/mL para BGN e de 0,003125 a 0,025µg/mL para leveduras.

RESULTADOS

Os 56 indivíduos avaliados apresentavam idades entre 19 e 57 (37,3 +/- 8,2) anos, sendo 17 do gênero feminino (30,4%) e 39 (69,6%) do masculino; do total, 49 (87,5%) estavam fazendo acompanhamento ambulatorial com médicos infectologistas do HDT e 7 (12,5%) eram pacientes do leito-dia, os quais apresentavam doença oportunística. Verificou-se que 31 pacientes (55,4%) não estavam usando medicamentos e 25 (44,6%) estavam fazendo terapia com anti-retrovirais e utilizando algum antimicrobiano. Os antimicrobianos mais usados eram: amoxicilina, azitromicina e trimetoprim sulfametoxazol.

Foram isolados 168 microrganismos da saliva dos 56 adultos portadores do HIV, sendo 54 leveduras (42 *Candida albicans*, 10 *C. parapsilosis* e 2 *C. glabrata*); 43 bastonetes Gram negativos (34 *Enterobacter cloacae* e 9 *Pseudomonas aeruginosa*); 42 estafilococos (34 *Staphylococcus aureus*, 8 estafilococos coagulase negativos) e 29 estreptococos do grupo mutans (21 *Streptococcus mutans* e 8 *S.sobrinus*).

Foi observada uma redução significativa na contagem dos microrganismos após a higienização e o bochecho. Os EGM foram os mais suscetíveis a ambos os anti-sépticos, não tendo sido detectados após o bochecho. Os estafilococos e BGN apresentaram contagens na ordem de 10^5 ufc antes de qualquer procedimento de higienização e bochecho, porém, após esses procedimentos, as contagens foram reduzidas para 10^1 , o que significa uma redução de 4 logs.

A Tabela 1 apresenta a distribuição dos microrganismos isolados, bem como as médias das contagens realizadas antes e após higienização e bochecho com anti-sépticos.

Tabela 1. Média da contagem das colônias (ufc/mL) isoladas da saliva de 56 portadores do HIV antes e após o uso de Periogard® ou Cepacol®.

Microrganismo	PERIOGARD®		CEPACOL®	
	Contagens – ufc/mL (média)		Contagens – ufc/mL (média)	
	ANTES	DEPOIS	ANTES	DEPOIS
EGM	$9,0 \times 10^5$	0,0	$20,0 \times 10^5$	0,0
ESTAFILOCOCOS	$7,0 \times 10^5$	$1,3 \times 10^1$	$11,7 \times 10^5$	$4,6 \times 10^1$
BGN	$5,7 \times 10^5$	$3,9 \times 10^1$	$4,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2$
LEVEDURAS	$2,3 \times 10^2$	$6,8 \times 10^0$	$3,5 \times 10^2$	$3,4 \times 10^1$

ufc – unidades formadoras de colônias, EGM – estreptococos do grupo mutans,

BGN – bastonetes Gram negativos

Com relação ao perfil de suscetibilidade aos anti-sépticos, observado nos isolados, a concentração de clorexidina presente em 1mL de Periogard® (0,06µg) foi capaz de inibir as leveduras e os estafilococos. O Cepacol® inibiu as leveduras, a maioria dos estafilococos e 63,7% dos BGN quando a sua concentração foi multiplicada em quatro vezes (0,2 µg/mL).

A Tabela 2 apresenta o perfil de suscetibilidade dos microrganismos isolados ante os anti-sépticos, mostrando a faixa de atividade antimicrobiana para cada isolado.

Tabela 2. Variação da concentração inibitória mínima (CIM) dos microrganismos isolados da saliva de 56 portadores do HIV frente ao Periogard® ou Cepacol®.

Microrganismos	n	PERIOGARD®	CEPACOL®
		(0,06 µg/mL CHX – ponto crítico)	(0,05 µg/mL CCP – ponto crítico)
EGM	29	0,06 – 0,48	0,05 – 0,2
ESTAFILOCOCOS	42	0,0002344 – 0,0009375	0,003125 – 0,1
BGN	43	0,001875 – 0,12	0,0125 – 0,2*
LEVEDURAS	54	0,0075 – 0,06	0,003125 – 0,025

EGM – estreptococos do grupo mutans, BGN – bastonetes Gram negativos, *63,7% das cepas foram inibidas, CHX – clorexidina, CCP – cloreto de cetilpiridínio.

DISCUSSÃO

A manutenção ou o restabelecimento da saúde bucal em indivíduos portadores do HIV é um desafio, pois a higiene bucal deve ser feita com motivação e esmero. Assim, o controle químico para evitar o desequilíbrio da microbiota teria papel coadjuvante em relação ao procedimento mecânico, considerando-se as dificuldades de manter os indivíduos motivados para uma limpeza adequada dos dentes (Cury, 1997).

As infecções oportunistas são relevantes nos pacientes HIV positivos. Nos indivíduos com AIDS e candidíase orofaríngea, o índice de frequência de *C. albicans* é seguido por *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e outras espécies não *albicans* (Hazen, 1995; Coleman et al., 1998). Em pacientes infectados pelo HIV, as espécies não *albicans* têm sido isoladas em 15% a 20 % dos pacientes e são representadas em maior número por *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata* (Barchiesi et al., 1993; Milan et al., 1998). Neste trabalho, foi observado o índice de 22,2% de espécies não *albicans*, representadas principalmente pela *C. parapsilosis*, o que difere dos dois estudos relatados.

Neste estudo observou-se também a presença de enterobactérias representadas por *Enterobacter cloacae* em 34 (60,71%) dos indivíduos infectados pelo HIV. Um achado preocupante é a detecção de *Pseudomonas aeruginosa* em nove indivíduos, visto que este é um microrganismo virulento que carrega genes de resistência antimicrobiana e está associado a inúmeras infecções, inclusive

hospitalares, podendo ocasionar grave risco à saúde dos portadores, sobretudo dos imunodeprimidos. Tsang et al. (2000) determinaram o perfil de coliformes e leveduras isolados da boca de 32 pacientes infectados por HIV em Hong Kong. *Enterobacter cloacae* e *C. albicans* foram os mais comumente isolados, mostrando índices de 28,8% e 54,8% , respectivamente.

Infecções por bactérias não oportunistas constituem importante causa de morbidade e mortalidade para adultos e crianças infectados pelo HIV. Entre os patógenos encontrados com mais frequência está o *S. aureus*, comumente associado ao uso de cateteres vasculares, antibióticos e a outros fatores de risco como a imunodepressão (Kovacs et al., 1997). Neste estudo detectou-se a presença de 42 (75,0%) estafilococos na saliva, sendo 34 *S. aureus* e 8 ECN.

Estudos têm mostrado que a cárie está associada a um aumento da proporção de bactérias acidúricas e acidogênicas, especialmente os estreptococos do grupo mutans e *Lactobacillus* (Marsh, 1999). Nos indivíduos estudados, os EGM foram isolados em apenas 29 pacientes. Isso se deve à baixa frequência de cárie observada nestes pacientes, em consequência do acompanhamento e do tratamento odontológico realizados no consultório do HDT.

A higienização e o bochecho com Periogard® ou Cepacol® mostraram-se eficientes na redução da carga microbiana, principalmente a dos estreptococos do grupo mutans. Deve-se ressaltar que esta redução microbiana deve estar associada tanto à higienização como ao uso dos anti-sépticos. Portanto, neste estudo não foi evidenciada a atividade antimicrobiana exclusiva dos anti-sépticos, mas sim, a associação do procedimento de higienização e do bochecho, visto que não foi estabelecido um grupo sem higienização ou sem a utilização de anti-sépticos. Jenkins et al. (1994) compararam três anti-sépticos utilizados na higiene bucal para inibir a formação do biofilme dentário e observaram maior efetividade dos bochechos com clorexidina e cloreto de cetilpiridínio do que com triclosan.

Pimenta (2001), em um estudo sobre a prevalência de EGM da saliva de 136 membros de 7 famílias, verificou que os anti-sépticos testados (Plax®, Cepacol® e Periogard®) foram efetivos contra EGM nas concentrações encontradas nas formulações comercialmente disponíveis (0,937 a 15,0µg/mL para o Periogard®; 1,56 a 6,25µg/mL para o Cepacol® e de 1,87 a 7,5µg/mL para o Plax®). Os valores de CIM apresentados no trabalho citado diferem dos valores encontrados neste estudo. Na análise da ficha de anamnese, 46 (82,1%) pacientes relataram a não-utilização de qualquer enxaguatório bucal, fato que poderia explicar a baixa resistência dos isolados ante os anti-sépticos.

A clorexidina apresentou uma melhor atividade contra os bastonetes Gram negativos quando comparada ao cloreto de cetilpiridínio (Tabela 2). A faixa de atividade variou de 0,01875 a 0,12 µg/mL para inibição de todos os bastonetes Gram negativos. O Cepacol® não foi capaz de inibir todos os BGN, mesmo quadruplicando-se a concentração da substância contida em 1mL da apresentação comercial.

Nas contagens de ufc/mL após o bochecho, tanto o Periogard® quanto o Cepacol® mostraram resultados significantes. *In vitro*, os dois anti-sépticos utilizados após a higienização mecânica foram eficazes na redução da microbiota da saliva, observando-se uma atividade menor do Cepacol® ante os bastonetes Gram negativos.

Ao se avaliar a suscetibilidade de microrganismos bucais, é importante considerar que estes, em sua maioria, se encontram consorciados em biofilme, portanto muito mais resistentes aos antimicrobianos. Contudo, os métodos utilizados para determinar a suscetibilidade se baseiam na CIM de culturas na forma planctônica. Dessa forma, a CIM é apenas um indicativo do perfil de suscetibilidade destes microrganismos no biofilme (Pratten, Barnett & Wilson, 1998).

CONCLUSÃO

Os indivíduos portadores do HIV apresentaram elevada prevalência de *C. albicans* na saliva, apesar da emergência de cepas não *albicans*. É preocupante a presença de microrganismos, como os estafilococos e as enterobactérias, na saliva destes pacientes imunodeprimidos, uma vez que são patógenos virulentos, com capacidade de disseminação, associados aos casos de infecções graves com alta morbidade. Os dois anti-sépticos testados são eficazes contra os microrganismos bucais isolados nas concentrações encontradas nas formulações comercialmente disponíveis. Assim, a maneira ideal de proporcionar boa higiene bucal é por meio de profilaxia mecânica, envolvendo escovação e uso de fio dental. E, em vista das condições microbiológicas (alterações do número e espécies microbianas) apresentadas, faz-se necessário o uso de substâncias químicas complementares, como os anti-sépticos utilizados neste trabalho.

ABSTRACT

Identification of microorganisms in saliva of human immunodeficiency virus patients before and after mouthwash with antiseptics

Buccal manifestations seem to be related with seropositivity for HIV, as well as alterations in the number and in types of microbial species. The aim of this study was to identify and to quantify the microorganisms before and after mouthwashes with antiseptic and to determine MICs of the isolated ones for Periogard® and Cepacol®. Two samples of saliva not stimulated of each patient were collected. The first collection was accomplished before any intervention and the second was made after instructions and practices of buccal hygiene and mouthwash with Periogard® or Cepacol®. The determination of MICs was accomplished by the dilution method in agar. Fifty four yeasts were isolated; 43 Gram negative rods; 42 staphylococci and 29 mutans streptococci (MS). The counts before and after mouthwash for

Periogard® resulted in a reduction of 5 logs for MS, 4 logs for staphylococci and Gram negative rods and 2 logs for yeasts; Cepacol® resulted in a reduction of 5 logs for MS, 4 logs for staphylococci, 3 logs for Gram negative rods and 1 log for yeasts. The MICs ranged for MS from 0.06-0.48µg/mL for Periogard®; 0.05-0.2µg/mL for Cepacol®; for staphylococci from 0.0002344-0.0009375µg/mL for Periogard®; 0.003125-0.1µg/mL for Cepacol®; for Gram negative rods from 0.001875-0.12µg/mL for Periogard®; 0.0125-0.2µg/mL for Cepacol® and yeasts from 0.0075-0.06µg/mL for Periogard®; 0.003125-0.025µg/mL for Cepacol®. *C. albicans* was the main isolate in saliva of HIV infected patients. Staphylococci and enterobacteriaceae in saliva has been reported as potential opportunistic pathogens. The use of antiseptic associated with supervised hygiene reduces significantly microbial load.

KEYWORDS: Microorganisms. Saliva. Human immunodeficiency virus. Antiseptic.

AGRADECIMENTOS:

Laboratório de Micologia Professora Maria do Rosário Rodrigues Silva e da mestranda Karla Carvalho Miranda por terem colaborado na identificação das leveduras.

REFERÊNCIAS

1. Barchiesi F, Morbidutcci V, Ancarani F, Scalise. Emergence of oropharyngeal candidiasis caused by non-albicans species of *Candida* in HIV- infected patients. *Eur J Epidemiol* 9: 455-456, 1993.
2. Anderson F, Calder L and Thomas E. Antibiotics prescription in Canadian. *J Med Microbiol* 49: 201-215, 2000.
3. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. *Programa Nacional de Doenças Sexualmente Transmissíveis/AIDS, Hepatites, AIDS e Herpes na prática odontológica*. Brasília, 1996.
4. CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute 2004. In: *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved Standard -Sixth Edition. Ferraro MJ (23) Number 2. Ano?
5. Coleman DC, Rinaldi MG, Haynes KA, Rex JH, Summerbell RC, Anaissie EJ, Li A, Sullivan DJ. Importance of *Candida* species other than *Candida albicans* as oportunistic pathogens. *Med Mycol* 36: 156-165, 1998.
6. Cury J A. Controle químico da placa dental. In: Kringer, L. *ABOPREV- Promoção de Saúde Bucal*. São Paulo. Artes Médicas, 1997. p. 255-281.
7. Davey AL, Rogers A.H. Multiple types of the bacterium *Streptococcus mutans* in the human mouth and their intra-family transmission. *Archs Oral Biol* 29: 453-460, 1984.
8. Devore LR. Antimicrobial mouthrinses: impacto in dental hygiene. *J Am Dent Assoc* 125: 23-28, 1994.
9. Fridkin SF, Jarvis WR. Epidemiology of nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol* 9: 499-511, 1996.
10. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 12: 501-517, 1999.
11. Hazen KC. New and emerging yeast pathogens. *Clin Microbiol Rev* 8: 462-478, 1995.
12. Jenkins S, Andy M, Newcombe RG. A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. *J Clin Periodontol* 21: 441-444, 1994.
13. Koneman EW, Allen SD, Dowell VR Jr., Sommers RS. *Diagnóstico Microbiológico – Texto e Atlas Colorado*. 5ª ed., São Paulo, 2001.

14. Korting HC, Schaller M, Eder G, Hamm G, Bohmer U, Hube B. Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* isolates from HIV-infected patients. *Antimicrobial Agents Chemother* 43: 2038-2042, 1999.
15. Kovacs A, Leaf HL, Simberkoff MS. Bacterial infections. *Med Clin North Am* 81: 319-343, 1997
16. Madigan A, Murray PA, Houpt M, Catalanotto F, Feuerman M S. Caries experience and cariogenic markers in HIV positive children and their siblings. *Pediatr Dentistry* 18: 129-136, 1996.
17. Magalhães MG. Lesões bucais em pacientes HIV positivos de diferentes categorias de transmissão. *RPG* 4: 401, 1996.
18. Manfredi R, Nanetti A, Ferri M, Chiodo F. *Enterobacter* spp. infections complicating the course of HIV disease. *J Chemother* 13: 195-201, 2001.
19. Marsh, PD. Microbiologic aspect of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* 43: 599-614, 1999.
20. Milan EP, Burattini MN, Kallas EG, Fischman O, Costa PRO, Colombo AL. Azole reistence among oral *Candida* species isolates from AIDS patients under ketoconazole exposure. *Diagn Microbiol Infect Dis* 32: 1115-1118, 1998.
21. Nguyen MH, Peacock JE Jr, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Yu VL. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *Am J Med* 100: 617-623, 1998.
22. Ouhayoun J. Penetrating the plaque biofilm: impact of essential oil mouthwash. *J Clin Periodontol* 30: 10-12, 2003.
23. Pimenta FC. *Streptococcus do grupo mutans: fidelidade intrafamiliar* [Tese de Doutorado em Microbiologia- UFRJ], 2001
24. Pratten J, Barnett P and Wilson M. Composition and susceptibility to chlorhexidine of multispecies biofilms in roral bactéria. *Appl Environ Microbiol* 64: 3515-3519, 1998.
25. Senthilkumar A, Kumar S, Sheagren JN. Increased incidence of *Staphylococcus aureus* bacteremia in hospitalized patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 33: 1412-1416, 2001.
26. Schimid-Westhausen A, Fehrenbach FJ, Reichart PA. Oral enterobacteriaceae in patients with HIV infection. *J Oral Pathol Med* 19: 229-231, 1990.
27. Sreenivasan P, Gafar A. Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol* 29: 965-974, 2002.
28. Torres A.S. *Avaliação do ágar SB20 e MSB na contagem de estreptococos do grupo mutans na saliva e na placa dental de adolescentes*. [Tese de Doutorado – Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP], 1991.
29. Tsang CS, Samaranyake LP. Oral yeasts and coliforms in HIV- infected individuals in Hong Kong. *Mycoses* 43: 303-308, 2000.
30. Westergren G, Krasse B. Evaluation of micromethod for determination fo *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* infection. *J Clin Microbiol* 7: 82-83, 1978.