

**CARMINDA SÍLVIA NUNES MONTEIRO DA CUNHA**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Porphyromonas gingivalis* E *Prevotella intermedia*  
ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL E ANÁLISE DAS  
RESISTÊNCIAS ANTIMICROBIANAS**



**Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade Fernando Pessoa  
Porto, 2017**



**CARMINDA SÍLVIA NUNES MONTEIRO DA CUNHA**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Porphyromonas gingivalis* E *Prevotella intermedia*  
ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL E ANÁLISE DAS  
RESISTÊNCIAS ANTIMICROBIANAS**



**Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade Fernando Pessoa  
Porto, 2017**



**CARMINDA SÍLVIA NUNES MONTEIRO DA CUNHA**

**IDENTIFICAÇÃO DE *Porphyromonas gingivalis* E *Prevotella intermedia*  
ISOLADAS DE PACIENTES COM DOENÇA PERIODONTAL E ANÁLISE DAS  
RESISTÊNCIAS ANTIMICROBIANAS**

Trabalho original realizado por

---

Dissertação apresentada à Universidade Fernando Pessoa  
como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Mestre em  
Microbiologia Clínica sob a orientação das Professoras Doutoradas  
Cristina Pina e Inês Lopes Cardoso.

## RESUMO

A cavidade oral é um dos locais do organismo humano que revela a mais complexa e heterogénea população microbiana, da qual fazem parte mais de meio milhar de espécies bacterianas.

A doença periodontal (DP) é uma patologia oral de origem bacteriana caracterizada por um estado inflamatório que começa por afetar o tecido gengival e cuja progressão leva frequentemente à perda de dentes na idade adulta. As gengivites e periodontites são das patologias periodontais que surgem com maior predomínio na rotina da clínica dentária. A identificação do microbioma responsável por este tipo de patologias é extremamente importante na adoção de medidas mais eficazes, quer de tratamento, quer de prevenção.

Certas estirpes de bactérias de Gram negativo têm sido encontradas de forma consistente em lesões periodontais, nomeadamente as espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Estas bactérias são de Gram negativo, anaeróbias estritas, imóveis, não esporuladas e produtoras de pigmento negro. A identificação destes microrganismos pode ser realizada pelos métodos convencionais, sendo tecnicamente complexos, dispendiosos e morosos ou por diversas técnicas de biologia molecular, nomeadamente a *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

A prevenção e o controlo das doenças periodontais residem na eliminação do biofilme microbiano, através de hábitos de higiene oral e tratamento mecânico local. No entanto, em alguns tipos de DP torna-se necessário o uso de antisépticos e/ou antibióticos. A identificação das espécies bacterianas implicadas na DP permite a prescrição do antibiótico específico, uma vez que se tem verificado uma tendência para a abordagem terapêutica empírica o que tem conduzido para um aumento da resistência aos antibióticos, particularmente nas espécies do género *Porphyromonas* e *Prevotella*.

Face ao exposto e à escassa informação acerca da identidade de estirpes bacterianas em infecções periodontais em Portugal e eventuais resistências desenvolvidas realizou-se um estudo preliminar de pesquisa das estirpes produtoras de pigmento negro, nomeadamente *P.gingivalis* e *P. intermedia* e da pesquisa da suscetibilidade antimicrobiana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, metronidazol, clindamicina e tetraciclina; assim como também, a pesquisa de enzimas  $\beta$ -lactamases. Neste trabalho foram analisadas 42 amostras de isolados subgengivais provenientes de pacientes com periodontites, da clínica dentária da Faculdade de Ciências da Saúde, da Universidade Fernando Pessoa, Porto.

Das 42 amostras, apenas 14 tiveram crescimento de colónias com pigmento negro. Destas, 57,1% foram identificadas como *P. intermedia*, 28,6% eram *P. gingivalis* e 14,2% pertenciam a outras espécies pigmentadas. Relativamente à prova de sensibilidade antimicrobiana, verificou-se que todas as amostras de *P. intermedia* foram sensíveis aos antibióticos testados, embora 14,3% de *Prevotella* spp tenha-se mostrado resistente à penicilina, amoxicilina, clindamicina e tetraciclina. Nenhum dos isolados da espécie *P. gingivalis* mostrou resistência aos agentes antimicrobianos ensaiados. A pesquisa de  $\beta$ -lactamases revelou que apenas 2 amostras tinham capacidade para a produção destas enzimas.

Os dois métodos utilizados neste trabalho mostraram-se eficazes no conhecimento das espécies bacterianas intervenientes na DP. Contudo, no método clássico várias amostras perderam viabilidade durante o processo de congelação, inviabilizando a sua cultura. Por outro lado, os métodos moleculares amplificaram todas as amostras tendo-se demonstrado como previsto uma técnica rápida e precisa.

As estirpes isoladas de *P. gingivalis* e *P. intermedia* foram sensíveis a todos os antibióticos testados, ao contrário do referido na literatura. Este resultado pode dever-se à reduzida amostragem deste estudo.

Da avaliação destes resultados preliminares é nossa proposta em estudos futuros alargar significativamente a amostragem, bem como a amplificação direta do ADN bacteriano colhido nas bolsas periodontais, de forma a não existir seleção cultural dos agentes microbianos. O estudo da suscetibilidade antimicrobiana com recurso a técnicas de biologia molecular é, também nossa proposta para a contribuição de uma maior sensibilidade e precisão de resultados.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Periodontite, Anaeróbios pigmentados, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, Antibióticos,  $\beta$ -lactamases.

## ABSTRACT

Oral cavity is one of the places in the human body that reveals the most complex and heterogeneous microbial population, which are a part over half of a thousand bacterial species.

Periodontal Disease (PD) is an oral pathology of bacterial origin characterized by an inflammatory state that starts affecting gingival tissue and progresses frequently to tooth lost in adult age. Gingivitis and periodontitis are the periodontal pathologies more frequently found in clinical dentistry routine. The identification of the microbiome responsible for these pathologies is of extreme importance due to the adoption of more effective measures of treatment and prevention.

Certain strains of Gram-negative bacteria have been consistently found in periodontal lesions namely *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*. These are Gram-negative bacteria, anaerobic, non-sporulating and producers of black pigment. The identification of these strains can be performed by conventional methods, which are complex, expensive and time-consuming, or by molecular biology techniques, namely *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

The prevention and control of periodontal diseases is based on the microbial biofilm elimination, through oral hygiene or mechanical and local treatment. However in some types of PD its necessary the use of anti-septic and/or antibiotics. The identification of the bacterial species involved in PD allows the prescription of a specific antibiotic, which is another approach to the empirical therapeutic lately, leading to the increase of antibiotic resistance namely of the species *Porphyromonas* and *Prevotella*.

Facing all the above and due to the lack of information regarding the identity of the bacterial strains in periodontal infections in Portugal and also due to antibiotic resistance, a preliminary study was developed based on the black pigment producers strains *P. gingivalis* and *P. intermedia*; search of antimicrobial susceptibility to  $\beta$ -lactam antibiotics, metronidazole, clindamycin and tetracycline, as well as the research of the  $\beta$ -lactamases enzymes. In this work it was analyzed 42 samples of subgingival isolates from patients with periodontitis from the dentistry clinic of Health Science faculty, Fernando Pessoa University of Oporto.

Of the 42 samples, only 14 revealed growth of black pigment colonies. From this ones, 57,1% were identified as *P. intermedia*, 28,6% were *P. gingivalis* and 14,2% belong to other pigmented species. Concerning the antimicrobial sensitivity to the antibiotic tested, all the samples of *P. intermedia* were sensitive, although 14,3% of *Prevotella* spp. was resistant to penicillin, amoxicillin, clindamycin and tetracycline. None of the isolates of *P. gingivalis* showed resistance to the antimicrobial agents tested. The search for  $\beta$ -lactamases shows that only 2 strains had the ability to produce it.

The two methods used in this work were effective in the identification of the bacterial strains involved in PD. However it was verified that using the classical method several samples loss viability during the freezing process, so they could not be cultured. On the other hand the molecular methods amplified all the samples as expected it was quick and precise.

The isolated strains of *P. gingivalis* and *P. intermedia* were sensitive to the antibiotics tested, opposite to literature references. This result may be due to the reduced sample number.

From this preliminary result evaluation is our proposal to engage future studies with a broader number of samples and using direct DNA amplification collected from periodontal pockets, a way from avoiding strain selection of the bacteria. The study of antimicrobial susceptibility based also in molecular biology techniques is, according to us, a better contribution to increase the sensibility and precision of the results.

## **KEYWORDS**

Periodontitis, Pigmented anaerobic, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, Antibiotics,  $\beta$ -lactamases.

## ÍNDICE GERAL

ABREVIATURAS .....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	v
ÍNDICE DE TABELAS .....	vii

	Pág.
<b>I. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ECOSISTEMAS ORAIS .....</b>	<b>5</b>
1.1. SALIVA E FLUIDO CREVICULAR .....	6
1.2. MICROBIOMA ORAL .....	7
1.3. PLACA SUPRAGENGIVAL E PLACA SUBGENGIVAL .....	10
<b>2. A DOENÇA PERIODONTAL .....</b>	<b>12</b>
2.1. ETIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL .....	15
2.1.1. BACIOS PRODUTORES DE PIGMENTO NEGRO ...	17
2.1.1.1. <i>Porphyromonas gingivalis</i> .....	18
2.1.1.2. <i>Prevotella intermedia</i> .....	23
2.2. TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL .....	25
2.2.1. USO DE ANTISÉPTICOS NA DP .....	25
2.2.2. USO DE ANTIBIÓTICOS NA DP .....	26
2.3. RESISTÊNCIAS BACTERIANAS AOS ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS .....	28
2.3.1. AS $\beta$ -LACTAMASES NA CAVIDADE ORAL .....	29
2.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL .....	31
2.4.1. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA .....	31
2.4.2. MÉTODOS DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	32
<b>OBJECTIVOS .....</b>	<b>34</b>

<b>II. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
<b>1. AMOSTRAGEM</b> .....	<b>36</b>
<b>2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS</b> .....	<b>36</b>
<b>3. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS COM PIGMENTAÇÃO NEGRA</b> ...	<b>38</b>
<b>3.1. METODOLOGIA CLÁSSICA</b> .....	<b>38</b>
<b>3.2. METODOLOGIA MOLECULAR</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.1. EXTRAÇÃO DO ADN BACTERIANO</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.2. AMPLIFICAÇÃO DO ADN BACTERIANO</b> .....	<b>39</b>
<b>3.2.3. ELETROFORESE</b> .....	<b>41</b>
<b>4. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1. MÉTODO DE KIRBY-BAUER</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1.1. LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO</b>	<b>44</b>
<b>4.2. PESQUISA DE ENZIMAS <math>\beta</math>-LACTAMASES</b> .....	<b>45</b>
<b>III. RESULTADOS</b> .....	<b>47</b>
<b>1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS</b> .....	<b>47</b>
<b>2. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS COM PIGMENTAÇÃO NEGRA</b> .....	<b>47</b>
<b>2.1. METODOLOGIA CLÁSSICA</b> .....	<b>47</b>
<b>2.2. METODOLOGIA MOLECULAR</b> .....	<b>48</b>
<b>2.3. COMPARAÇÃO ENTRE A METODOLOGIA CLÁSSICA E MOLECULAR</b>	<b>50</b>
<b>3. SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA</b> .....	<b>51</b>
<b>3.1. LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO</b> .....	<b>51</b>
<b>3.2. LEITURA DA PESQUISA DE ENZIMAS <math>\beta</math>-LACTAMASES</b> .....	<b>53</b>
<b>IV. DISCUSSÃO</b> .....	<b>55</b>
<b>V. CONCLUSÕES</b> .....	<b>60</b>

<b>VI. BIBLIOGRAFIA</b>	.....	<b>62</b>
-------------------------	-------	-----------

<b>VII. ANEXOS</b>	.....	<b>77</b>
--------------------	-------	-----------

## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>AMC</b>	Amoxicilina+ácido clavulânico
<b>AML</b>	Amoxicilina
<b>API</b>	Índice de Perfil Analítico ( <i>Analytical Profile Index</i> )
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>DA</b>	Clindamicina
<b>DP</b>	Doença Periodontal
<b>D</b>	Desnaturação
<b>E</b>	Emparelhamento
<b>EDTA</b>	Etilenodiaminotetracetato
<b>EUCAST</b>	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>Ex</b>	Extensão
<b>I</b>	Intermédia
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>IgA-secretora</b>	Imunoglobulina A-secretora
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeos
<b>µg</b>	Micrograma
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>MTZ</b>	Metronidazol
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NCCLS</b>	<i>National Committee for Clinical Laboratories Standards</i>

<b>PBS</b>	Solução salina de tampão fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEN</b>	Penicilina
<b>Pg1</b>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 1
<b>Pg2</b>	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 2
<b>Pi1</b>	<i>Prevotella intermedia</i> 1
<b>Pi2</b>	<i>Prevotella intermedia</i> 2
<b>R</b>	Resistente
<b>RNAr 16S</b>	Ácido ribonucleico ribossomal 16S
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RTF</b>	Fluido reduzido de transporte ( <i>Reduced Transport Fluid</i> )
<b>S</b>	Sensível
<b>TE</b>	Tetraciclina
<b>TSB</b>	Caldo de triptona de soja ( <i>Trypticase Soy Broth</i> )
<b>U</b>	Unidade
<b>UFP</b>	Universidade Fernando Pessoa
<b>UV</b>	Ultravioleta

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Exemplo de ecossistemas orais .....	6
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de um biofilme .....	9
<b>Figura 3.</b> Localização da placa subgengival e supragengival .....	12
<b>Figura 4.</b> Progresso desde gengiva saudável, gengivite, periodontite até periodontite avançada .....	14
<b>Figura 5.</b> Evolução da doença periodontal, com formação da bolsa periodontal e progressiva destruição do osso alveolar .....	15
<b>Figura 6.</b> Comparação do dente que exhibe uma gengiva saudável relativamente com o dente que mostra uma redução gengival .....	16
<b>Figura 7.</b> Morfologia de <i>P. gingivalis</i> – fotografia de microscopia electrónica. (C) cápsula .....	21
<b>Figura 8.</b> Vesículas de <i>P.gingivalis</i> .....	22
<b>Figura 9.</b> Fimbrias de <i>P. gingivalis</i> (A); Co-agregação bacteriana entre <i>P. gingivalis</i> (PG) e <i>Fusobacterium nucleatum</i> (Fn) (B) .....	22
<b>Figura 10.</b> Cultura de <i>Porphyromonas gingivalis</i> (A), com evidência do pigmento negro (B) .....	24
<b>Figura 11.</b> Sistema automático gerador de atmosfera anaeróbia, acoplado a jarra de anaerobiose .....	38
<b>Figura 12.</b> Cultura pura com colónias negras, isoladas e definidas .....	38
<b>Figura 13.</b> Exemplo de uma galeria de ID32A utilizada para a identificação bioquímica das bactérias isoladas .....	39
<b>Figura 14.</b> Fotografia do gel de agarose da amplificação de algumas amostras, com aplicação na electroforese .....	43

<b>Figura 15.</b> Meio de Columbia agar base semeado e com disco de antibiótico aplicado no centro da placa de Petri .....	<b>44</b>
<b>Figura 16.</b> Exemplo de um halo de inibição de crescimento bacteriano em redor do disco de antibiótico .....	<b>45</b>
<b>Figura 17.</b> Exemplo de disco de nitrocefim utilizado para pesquisa de enzimas $\beta$ -lactamases .....	<b>46</b>
<b>Figura 18.</b> Suscetibilidade da estirpe da amostra 37, aos antibióticos .....	<b>53</b>
<b>Figura 19.</b> Suscetibilidade da estirpe da amostra 38, aos antibióticos .....	<b>53</b>

## ÍNDICE DE TABELAS

	Pág.
<b>Tabela I.</b> Tipos de periodontite e espécies bacterianas predominantes .....	18
<b>Tabela II.</b> Fatores de virulência de <i>Porhyromonas gingivalis</i> .....	25
<b>Tabela III.</b> Fatores de virulência da <i>Prevotella intermedia</i> .....	26
<b>Tabela IV.</b> Sequência dos oligonucleóticos utilizados para caracterização das amostras por PCR. ....	40
<b>Tabela V.</b> Mistura dos reagentes necessários para a reação de PCR .....	41
<b>Tabela VI.</b> Condições de amplificação (°C/min). D (Desnaturação); E (Emparelhamento); Ex (Extensão) .....	42
<b>Tabela VII.</b> Identificação das amostras cultiváveis por <i>Kit</i> comercial Rapid ID32A .....	49
<b>Tabela VIII.</b> Identificação dos isolados das amostras clínicas por PCR .....	50
<b>Tabela IX.</b> Isolados bacterianos produtores de pigmento negro identificados por <i>Kit</i> comercial Rapid ID32A e confirmados por PCR .....	51
<b>Tabela X.</b> Interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade aos antibióticos .....	52
<b>Tabela XI.</b> Resultados dos testes de nitrocefim .....	54

## I. INTRODUÇÃO

A cavidade oral é um dos locais do organismo humano que revela a mais complexa e heterogênea população microbiana, em que coabitam fungos, vírus, protozoários, *Archaea* e mais de meio milhão de espécies bacterianas. Neste contexto, surge o conceito de microbioma oral, definido como todos os microrganismos que são encontrados sobre ou dentro da cavidade oral humana e suas extensões contíguas, até ao esôfago distal. As diversas e específicas características que a cavidade oral ostenta, favorecem a existência de microambientes adaptados para a instalação de diferentes tipos de microrganismos com predomínio de bactérias anaeróbias facultativas e estritas, das quais mais de metade são bactérias não cultiváveis (Dewhirst *et al.*, 2010). As complexas comunidades bacterianas que compõem o microbioma oral têm sido caracterizadas por métodos moleculares, não dependentes de cultura, como a sequenciação dos genes codificadores do RNAr 16S. Segata e colaboradores (2012) utilizaram este método para caracterizar as comunidades bacterianas de 7 amostras da cavidade oral e apuraram que eram colonizadas por três comunidades bacterianas distintas. Neste estudo foi demonstrado que a mucosa bucal, gengiva e palato duro têm uma microbiota semelhante, enquanto a saliva, língua, amígdalas e garganta possuíam uma comunidade distinta, assim como a placa supra e subgengival (Segata *et al.*, 2012).

São várias as bactérias odontogênicas destacando-se os géneros *Streptococcus*, *Veillonella*, *Granulicatella*, *Gamella*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Rothia*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Capnocytophaga*, *Nisseria*, *Haemophilis*, *Treponema*, *Lactobacterium*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacteria*, and *Propionibacterium* (Aas *et al.*, 2005; Jenkinson e Lamont, 2001; Wilson, 2001; Zaura *et al.*, 2009; Bik *et al.*, 2010).

A doença periodontal (DP) é uma patologia oral que pode persistir na ausência de tratamento, sendo a causa mais frequente da perda de dentes na idade adulta. Um inadequado ou ausente tratamento de um estado inflamatório, pode evoluir para uma situação de cronicidade em que a mucosa gengival edemaciada é progressivamente destruída até que se destaca do dente com a consequente formação de uma bolsa no periodonto, sendo instalado um quadro de periodontite (American Academy of Periodontology, 2013).

A exposição do periodonto à placa bacteriana conduz à acumulação de microrganismos em redor do dente, na margem externa e interna da gengiva com o estabelecimento de um processo infeccioso (Socransky e Haffajee, 2002). A flora microbiana da placa bacteriana na superfície dentária adjacente ao sulco gengival tende a propagar-se para tecidos de sustentação mais profundos com a formação de bolsas periodontais marcadas. Estas bolsas, associadas à migração do epitélio da mucosa oral e posterior perda óssea, criam um ambiente favorável à ação de agressores biológicos e/ou químicos conduzindo à destruição estrutural do periodonto por necrose celular com erosão do osso alveolar, culminando com a mobilidade da estrutura dentária e consequente perda de dentes (Kaldahl *et al.*, 1996; Meng, 1999; Pihlstrom e Tabak., 2005).

A etiologia dos microrganismos implicados nas doenças periodontais é complexa, com grande diversidade de bactérias responsáveis pelo início e progressão da patologia oral (Socransky e Haffajee, 2002). São conhecidas várias centenas de espécies bacterianas presentes na cavidade oral. No entanto, apenas um escasso número de espécies particulares da microflora subgengival demonstraram relevância no começo e na progressão da periodontite.

De acordo com Socransky e colaboradores (1998) os agentes infecciosos que têm sido encontrados de forma consistente em lesões periodontais, são bactérias de Gram negativo, anaeróbias estritas e microaerofílicas. Entre estas encontram-se *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e espiroquetas orais, como por exemplo *Treponema denticola* (Kumar *et al.*, 2003; Kuramitsu *et al.*, 2007; Maestre *et al.*, 2007; Filoche *et al.*, 2010; Dashiff e Kadouri, 2011).

A instalação da infeção periodontal depende, primariamente, da capacidade que as bactérias patogénicas possuem de adesão aos tecidos do hospedeiro. Posteriormente, intervêm outros fatores intrínsecos e comportamentais do hospedeiro que irão determinar a grandeza e rapidez do desenvolvimento de uma infeção periodontal (Komman e Page, 1997; Pihlstrom e Tabak, 2005). Assim, a presença de

microrganismos patogénicos não é o único fator necessário para a ocorrência de um quadro de periodontite, existindo outros aspetos a considerar como a ausência de microrganismos protetores, a presença de um ambiente favorável e um deficiente sistema imunitário (Socransky e Haffajee, 1991; Philstrom *et al.*, 2005). Na realidade, a DP depende de alterações decorrentes da inter-relação entre a virulência dos microrganismos e a capacidade de defesa do hospedeiro (Al-Haroni *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2006).

A cavidade oral é caracterizada por ter um ambiente onde ocorrem diversas interações entre microrganismos, estruturas e fluídos. Possui características de humidade, pH e temperatura ideais para o desenvolvimento bacteriano, constituindo um ambiente com várias centenas de espécies microbianas (Socransky e Haffajee, 2002; Wade, 2013). Os microrganismos orais adaptam-se a ambientes em mudança dentro da proteção concedida pelos biofilmes (Avila *et al.*, 2009). Os biofilmes são conjuntos complexos de microrganismos que habitam nas superfícies duras e na mucosa da cavidade oral (Flemmig e Beikler, 2011). O biofilme possui uma função protetora do esmalte dentário no entanto também é fonte de substratos para os microrganismos da placa bacteriana (Marsh, 2003). Um pequeno número de espécies de bactérias dos biofilmes orais parece estar implicado em infeções periodontais, como agentes patogénicos. Muitos destes microrganismos são, vulgarmente, detetados em indivíduos saudáveis (Wade *et al.*, 2013). Neste contexto, enquanto as colónias de microrganismos desempenham um papel vital na manutenção da homeostase oral, também são intervenientes em doenças orais (Flemmig e Beikler, 2011).

A placa bacteriana subgingival é mais complexa do que a placa bacteriana supragingival, por estar agregada ao dente e ao tecido conjuntivo de suporte dentário (Socransky e Haffajee, 2002; Haffajee *et al.*, 2007). Estima-se que várias centenas de espécies bacterianas estejam localizadas na placa subgingival, contudo poucas estão implicadas na DP (Becker *et al.*, 1990; Piovano, 1999; Paster *et al.*, 2001; Byrne, *et al.*, 2009).

Nas infeções periodontais, uma grande percentagem dos agentes isolados é anaeróbia estrita (van Winkelhof *et al.*, 2005). A identificação clássica de microrganismos anaeróbios estritos é tecnicamente complexa, morosa e dispendiosa (Song, 2005). Por estas razões, em Portugal, assim como em muitos outros países, os

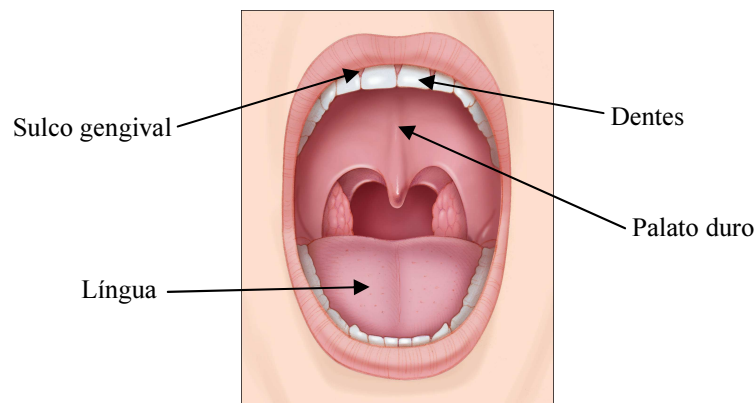
estudos de identificação e de suscetibilidade a agentes antimicrobianos, para estas bactérias da cavidade oral não fazem parte das rotinas clínicas de Medicina Dentária, pelo que a terapêutica antimicrobiana é frequentemente empírica.

De acordo com vários investigadores (Aldridge *et al.*, 2001; Papaparaskevas *et al.*, 2005) os níveis de resistência dos anaeróbios estritos a certos antibióticos, como ampicilina/sulbactam e clindamicina têm sofrido um aumento tendencial.

Neste contexto, a identificação da microbiota responsável pelas periodontites e suas resistências aos antibióticos são de extrema relevância, pois conduzem à adoção de medidas eficazes na terapêutica da DP limitando os danos tecidulares e encurtando o tempo de infeção.

## 1. ECOSISTEMAS ORAIS

Os dentes, o sulco gengival, a língua, as bochechas, os palatos duro e mole e as amígdalas (Dewhirst *et al.*, 2010), cada um destes locais proporciona ambientes onde as comunidades microbianas podem florescer (Figura 1). Diferentes tipos de microrganismos habitam nichos ecológicos distintos, de acordo com os diferentes tipos de superfícies e suas funções (Aas *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Exemplo de ecossistemas orais (adaptado de <http://www.lasersinent.com/laser-indication.html>, [Em linha] Consultado em 21-07-2016).

A mucosa oral constitui uma importante barreira física que interage com microrganismos periodontopatogênicos e promove, inicialmente, mecanismos de defesa por meio de proteínas antimicrobianas (Chung *et al.*, 2004; Shelburne *et al.*, 2005). Os agentes patogênicos que conseguem ultrapassar esta barreira protetora, em condições normais de imunocompetência do hospedeiro, são fortemente combatidos pelo sistema imunológico, através de diferentes estratégias de defesa, como por exemplo o recurso a células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) (Deas *et al.*, 2003).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro, a predisposição genética, condições socioeconômicas entre outros parâmetros, são capazes de influenciar a constituição da microbiota oral (Papapanou *et al.*, 1988; Umeda *et al.*, 1998; van Winkelhoff *et al.*, 1996).

De entre os diversos ecossistemas constituintes da cavidade oral, a saliva, o fluido crevicular ou gengival e as estruturas dentárias são os componentes mais diferenciados.

### 1.1. SALIVA E FLUÍDO CREVICULAR

A saliva e o fluido crevicular desempenham relevantes funções no estado de saúde oral não só em termos quantitativos, como qualitativos (Sreebny *et al.*, 1992).

A saliva é constituída essencialmente por água (99%), substâncias orgânicas e inorgânicas. Este fluido é fundamental na manutenção da integridade das estruturas orais, na digestão, na prevenção e controlo de infeções na cavidade oral. A barreira protetora formada pela saliva foca-se essencialmente, na capacidade de diluição e eliminação de açúcares, no controlo do pH, no equilíbrio da desmineralização/remineralização e na atividade antimicrobiana (Nieuw e Veeman, 2002, George, 2008; Filoche *et al.*, 2010).

A saliva funciona como sistema tampão pois neutraliza os produtos ácidos resultantes do metabolismo bacteriano, evitando que microrganismos patogénicos encontrem um meio capaz para a sua colonização e, simultaneamente, também previne a desmineralização do esmalte dentário (Nieuw e Veeman, 2002; de Almeida *et al.*, 2008; Filoche *et al.*, 2010).

A atividade antibacteriana da saliva é conseguida pelos seus constituintes, sejam eles de natureza imunológica ou não (Schenkels *et al.*, 1995; Humphrey e Williamson, 2001). O componente imunológico da saliva presente em maior quantidade é a IgA-secretora. Esta imunoglobulina funciona como anticorpo para os antigénios bacterianos, sendo capaz de agregar bactérias inibindo a capacidade de aderência destas à mucosa oral (Schenkels *et al.*, 1995; Humphrey e Williamson, 2001). Outros elementos imunológicos, tais como a IgG e IgM, ocorrem em frações menores e têm, presumivelmente, origem no fluido gengival (Edgar, 1992; Humphrey e Williamson, 2001). Quanto aos componentes salivares não imunológicos destacam-se enzimas (lisozima, lactoferrina e peroxidase), glicoproteínas, aglutininas, histatinas e mucinas (Schenkels *et al.*, 1995; de Almeida *et al.*, 2008).

O fluido crevicular é uma secreção oral que banha o sulco gengival. Possui uma composição análoga ao soro sanguíneo, com destaque para a fração acelular, fundamentalmente constituída por proteínas plasmáticas, como a albumina e as imunoglobulinas, IgA, IgG e IgM (Edgar, 1992; Domenica *et al.*, 2009), enquanto na

fração celular encontram-se células epiteliais de descamação e leucócitos, em particular linfócitos (T e B), monócitos e neutrófilos.

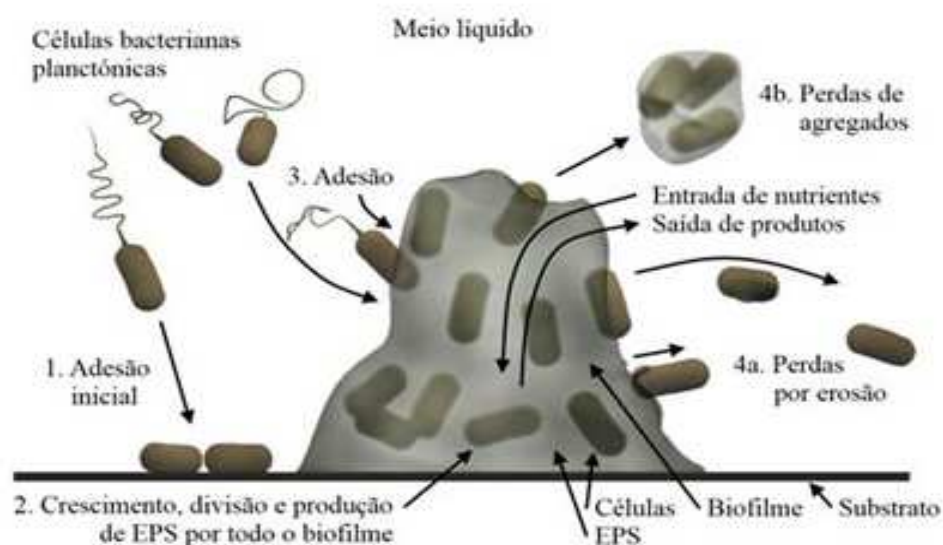
## 1.2. MICROBIOMA ORAL

A presença do biofilme oral é um pré-requisito fundamental para o início e progressão da DP. No entanto, algumas espécies bacterianas apresentam características importantes na patogênese da doença em consequência de vários fatores de virulência diretamente relacionados com a inibição da defesa do hospedeiro e com a ativação de mediadores da inflamação relacionados, principalmente à perda de osso alveolar (Axelsson, 2000).

Um biofilme pode ser definido como um ecossistema microbiano, perfeitamente estruturado e dinâmico que atua de forma coordenada. Este complexo ecossistema pode ser formado por populações desenvolvidas por uma única, ou por múltiplas espécies microbianas fortemente aderidas a superfícies bióticas e/ou abióticas (Wilson, 2001). A dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas e resulta da combinação de diversos processos de natureza física ou biológica. A colonização bacteriana às superfícies dentárias inicia-se pela adesão de microrganismos à película adquirida (camada acelular constituída essencialmente por proteínas salivares), a qual proporciona uma superfície adequada à aderência de bactérias e que favorece o crescimento contínuo do biofilme, sendo este considerado a principal causa das infeções da cavidade oral (Kolenbrander, 1993; Rosan e Lamont, 2000). Diversos trabalhos têm revelado a importância dos microrganismos constituintes do biofilme, na instalação e progressão da DP (Slots, 1977; Socransky *et al.*, 1998; Ximenés-Fyvie *et al.*, 2000).

Inicialmente, os microrganismos livres identificados de colonizadores primários, são transferidos da saliva para as estruturas dentárias, onde aderem, geralmente a proteínas e a outros compostos orgânicos. Segue-se a proliferação celular, com a utilização de nutrientes provenientes do meio líquido envolvente, saliva e resíduos da dieta, conduzindo à formação de uma ampla rede de colónias microbianas. As bactérias aderidas, por sua vez, sintetizam uma matriz exopolissacarídica, que vai servir como substrato para a fixação de novos microrganismos, os colonizadores secundários (Rickard *et al.*, 2003). Ao longo do tempo, a composição microbiana do biofilme oral sofre tendencialmente modificações, devido ao amadurecimento e evolução das relações

estabelecidas entre os colonizadores presentes (Figura 2). Na superfície dentária, local de grande *stress* mecânico, o biofilme é extremamente compacto e estratificado. Os espaços intersticiais presentes no biofilme, tanto permitem como condicionam a circulação de nutrientes e metabolitos, e deste modo são criados nos biofilmes estados de anaerobiose, em ambientes naturalmente aeróbios, permitindo o desenvolvimento de relações de simbiose, onde dois tipos de microrganismos metabolicamente distintos dependem um do outro para utilizarem certos substratos, na produção de energia (Rickard *et al.*, 2003).



**Figura 2.** Ciclo de vida de um biofilme (fonte: Menoita *et al.*, 2012).

O biofilme oral possui propriedades gerais análogas a outros biofilmes existentes no organismo humano, no entanto, a densidade bacteriana neste biofilme é cerca de 1000 vezes maior do que na saliva (Anderson, 2002).

O biofilme oral, quando fixo à estrutura dentária é designado de placa bacteriana. A placa bacteriana, nas diversas zonas de um mesmo dente exibe diferenças na composição microbiana (Spratt e Pratten, 2003). As bactérias presentes na placa bacteriana possuem uma fisiologia diferente das que existem na cavidade oral, na forma planctônica. Encontram-se num estado de latência, com o metabolismo reduzido, devido à limitação da disponibilidade de nutrientes (ten Cate, 2006).

As superfícies lisas dos dentes, mais expostas ao ambiente oral, são colonizadas por um limitado número de bactérias, que apresentam características específicas de resistência e viabilidade em ambiente tão hostil. A capacidade de acumulação de placa bacteriana está intimamente relacionada com as características anatómicas dos dentes. As fissuras, fossetas dentárias, sulco gengival e ainda, próteses e aparelhos dentários não só proporcionam proteção e correção, como ainda são favoráveis à acumulação de resíduos da dieta e promovem a disponibilidade de nutrientes para os organismos bacterianos (Marsh, 2003; Spratt e Pratten, 2003). Na verdade, o tipo e a disponibilidade de nutrientes são importantes fatores, quer para o desenvolvimento bacteriano, quer para o tipo de microrganismos (Love, 2002). Assim, os microrganismos colonizadores iniciais, anaeróbios facultativos, que obtêm energia pela fermentação de hidratos de carbono, com o tempo e diminuição da disponibilidade de oxigénio vão ser substituídos por microrganismos microanaeróbios e anaeróbios estritos, conhecidos por colonizadores secundários (Mims *et al.*, 1995). Neste contexto, a colonização da película adquirida começa por microrganismos livres, que são transportados da saliva para a estrutura dentária onde aderem. Estes são essencialmente cocos de Gram positivo, que derivam dos microrganismos da fase planctónica e/ou da proliferação das células bacterianas já existentes na mucosa oral (Bernimoulin, 2003). Estes colonizadores são predominantemente da espécie *Streptococcus* (60%-90%) e, em menor escala ocorrem estirpes de *Eikenella spp.*, *Haemophilus spp.*, *Prevotella spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Priopionibacterium spp.*, e *Veillonella ssp.* Segue-se a proliferação celular com a utilização de nutrientes provenientes do meio líquido envolvente, saliva e resíduos da dieta, conduzindo à formação de uma ampla rede de colónias bacterianas. Outras bactérias aderem, como as espécies de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Eubacterium spp.* e *Treponema spp.* (ten Cate, 2006). Este último conjunto bacteriano, os colonizadores secundários, é constituído, maioritariamente, por bactérias microaerófilicas e anaeróbias estritas, porque o ambiente onde proliferam é rico em dióxido de carbono e hidrogénio, estes gases são resultantes do metabolismo dos colonizadores primários (Marsh, 2003). Bactérias, como *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*, bacilos produtores de pigmento negro de Gram negativo, são capazes de degradar proteínas séricas em péptidos e em aminoácidos disponíveis para a fermentação (Sundqvist *et al.*, 1985). A degradação proteica pelas espécies *Prevotella* e

*Porphyromonas* facilita o crescimento de outras espécies bacterianas que dependem da disponibilidade de péptidos, como por exemplo, as Eubactérias, Fusobactérias e Peptostreptococos, as quais embora produzam peptidases, são incapazes de degradar proteínas intactas (Jansen e van der Hoeven, 1997).

Na mucosa oral não ocorre acumulação significativa de bactérias, devido à elevada velocidade de descamação das células epiteliais que impede a facilidade de adesão microbiana na mucosa da cavidade bucal (Spratt e Pratten, 2003).

### 1.3. PLACA SUPRAGENGIVAL E PLACA SUBGENGIVAL

A placa bacteriana, tendo em conta a margem gengival, é diferenciada em placa supragengival, e placa subgengival (Spratt e Pratten, 2003). Esta caracterização da placa bacteriana, não só tem em conta a sua localização na estrutura dentária, como o tipo de colonização microbiana por populações bacterianas distintas (Figura 3).



**Figura 3.** Localização da placa subgengival e supragengival (fonte: <http://www.zahn.de/red/behandlungsablauf-professionelle-zahnreinigung-597.asp>, [Em linha] Consultado em 21/07/2016).

Está determinado que a placa supragengival é formada por uma fina camada microbiana, composta de espécies bacterianas morfológicamente distintas com predomínio de cocos de Gram positivo, essencialmente por bactérias anaeróbias facultativas e microaerofílicas do género *Streptococcus* (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. mitis*,

---

*S. salivarius*) e *Lactobacillus* (*L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. brevis*) firmemente aderidos sobre o esmalte e superfície radicular (Listgarten, 1976; Slots, 1977; Listgarten, 1994).

A placa subgengival é frequentemente caracterizada por uma população bacteriana de Gram negativo e de espécies móveis, localizada adjacente ao revestimento epitelial das bolsas periodontais (Listgarten, 1994). Esta placa é formada principalmente por bactérias de Gram negativo, anaeróbias estritas e microaerofílicas, como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia*, *Campylobacter spp.*, *Capnocytophaga spp.*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, e espiroquetas orais e têm sido envolvidas nas periodontites (Sanz *et al.*, 2004; Kuramitsu *et al.*, 2007; Atieh, 2008).

A placa bacteriana subgengival é muito mais complexa do que a placa supragengival, por estar fortemente agregada ao dente e ao tecido conjuntivo de suporte dentário (Socransky e Haffajee, 2002; Haffajee *et al.*, 2007). Estudos indicam que várias centenas de espécies bacterianas estão localizadas ao nível da placa subgengival (Becker *et al.*, 1990; Piovano, 1999; Paster *et al.*, 2001; Byrne, *et al.*, 2009). A proliferação de populações microbianas mistas depende das cadeias alimentares e do metabolismo das espécies que fornecem nutrientes essenciais para o seu crescimento e desenvolvimento de outras espécies (Marsh, 1989; Ohta *et al.*, 1991; Jansen e van der Hoeven, 1997).

O sulco gengival clinicamente saudável, possui pouca profundidade e é preenchido por um pequeno número de microrganismos, predominantemente bastonetes Gram positivo, anaeróbios facultativos, como *Actinomyces* (Listgarten, 1976; Slots, 1977). A maioria das espécies bacterianas da placa subgengival é inicialmente aeróbia, microaerofílica, sacarolítica e metabolicamente produz grandes quantidades de compostos orgânicos finais que compõem a matriz da placa bacteriana, sendo parcialmente permeável ao oxigénio. O aumento de espessura da placa bacteriana promove, nos depósitos mais profundos, condições de anaerobiose em que o crescimento e multiplicação microbiana variam de acordo com os níveis de oxigénio. Esta redução gradual da tensão de oxigénio permite o desenvolvimento de espécies microaerofílicas e anaeróbias estritas Gram negativo (Listgarten, 1994).

As fontes de nutrientes para as bactérias constituintes da placa supragengival são os produtos da dieta dissolvidos na saliva, enquanto para as bactérias da placa subgengival os seus nutrientes advêm dos tecidos subjacentes (conjuntivo e sanguíneo). A colonização primária inicia-se por bactérias de Gram positivo facultativas, seguidas de bactérias de Gram negativo e com o envelhecimento da placa bacteriana, ocorrem mudanças ecológicas surgindo uma colonização secundária por bactérias de Gram negativo anaeróbias estritas. Esta conversão da placa bacteriana “aeróbia” para uma placa “anaeróbia” é acompanhada por um processo inflamatório da mucosa oral, designada de gengivite. A progressão da inflamação, com eventual perda de integridade dos tecidos subjacentes, conduz à depressão do sulco gengival, com aumento da área subgengival e à reabsorção óssea, proporcionando a instalação de um quadro de periodontite (Lindhe *et al.*, 1975; Marsh, 1994; Marsh e Bradshaw, 1997; Bascones e Figuro, 2005).

O microambiente subgengival da bolsa periodontal é constituído por grande diversidade microbiana, com mais de 700 espécies isoladas de diversos microrganismos, entretanto, poucas espécies estão associadas com a DP (Paster *et al.*, 2001; Byrne *et al.*, 2009).

Dahlén e colaboradores (1992) mostraram que bolsas periodontais profundas não são pré-requisitos da microbiota para a instalação de *Porphyromonas gingivalis*, uma vez que repararam numa elevada ocorrência desta espécie bacteriana, em indivíduos sem DP (Dahlén *et al.*, 1992).

No entanto, estudos posteriores demonstraram a ocorrência e acentuada proliferação de *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e espécies de *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* em amostras colhidas das placas supra e subgengival, de doentes com periodontite (Ximenés-Fyvie *et al.*, 2000; Sanz *et al.*, 2004; Atieh, 2008).

## **2. DOENÇA PERIODONTAL**

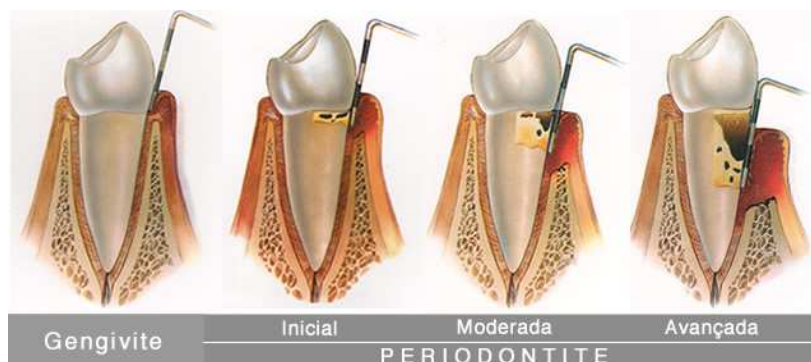
Entende-se por DP todo um conjunto de condições inflamatórias de carácter crónico, com origem etiológica bacteriana que não só afeta o periodonto, como os tecidos de suporte das estruturas dentárias (Lindhe *et al.*, 2003).

A DP é o termo geral usado na referência de patologias que afetam o periodonto (inserção gengival, as gengivas, ligamento periodontal, cemento radicular e osso alveolar de sustentação do dente). O diagnóstico do tipo de DP resulta da conjugação de vários aspectos, como clínicos, microbianos, do hospedeiro e do ambiente (Pihlstrom e Tabak, 2005). A contribuição de cada um destes fatores é determinante para a caracterização do tipo de DP, sendo as gengivites e as periodontites, patologias que surgem com maior predomínio na rotina da clínica dentária (Figura 4).



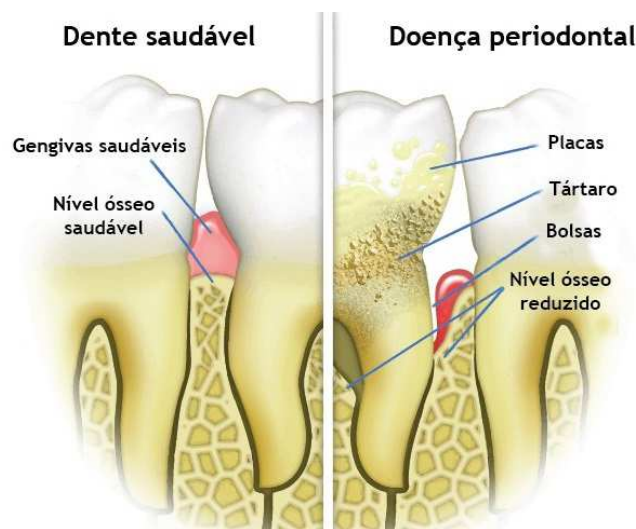
**Figura 4.** Progresso desde gengiva saudável, gengivite, periodontite até periodontite avançada (fonte: <http://www.ligadodontista.com.br/gengivite-e-periodontite-doencas-que-amolecem-os-dentes/>, [Em linha] Consultado em 21/07/2016).

A periodontite pode ser definida como uma doença inflamatória dos tecidos de suporte dos dentes, causada por grupos de microrganismos específicos, que resulta numa migração apical progressiva do ligamento periodontal e osso de suporte (Lindhe *et al.*, 2003) (Figura 5).



**Figura 5.** Evolução da doença periodontal, com formação da bolsa periodontal e progressiva destruição do osso alveolar (fonte: adaptado de <http://www.periodontalhealthcenter.com/Seriodontic-Scaling-Root-Planning>)

A periodontite manifesta-se por uma inflamação extensa nas estruturas mais profundas do periodonto, cuja característica mais comum consiste na formação da bolsa periodontal. Esta bolsa resulta de uma invaginação do epitélio gengival ao longo da raiz do dente que, gradualmente irá conduzir à destruição do ligamento periodontal e do osso alveolar. A perda de suporte ósseo e a contínua migração apical do epitélio oferece menor resistência aos agentes invasores, o que perpetua o processo inflamatório com destruição de constituintes do periodonto, conduzindo à mobilidade dentária com consequente perda de dentes (Pihlstrom e Tabak., 2005) (Figura 6).



**Figura 6.** Comparação do dente que exibe uma gengiva saudável relativamente com o dente que mostra uma redução gengival e consequente formação da bolsa periodontal e progressiva destruição do osso alveolar (fonte:<http://fortíssima.com.br/2015/07/31/higiene-oral-e-melhor-forma-de-prevenir-doenca-periodontal-14703877> [Em linha] Consultado em 05/06/2017).

A identificação da microbiota responsável pela manifestação das patologias periodontais é de extrema importância, pois deveria preceder a adoção de medidas eficazes na sua prevenção e tratamento, contudo estas medidas são na sua maioria de base empírica.

De acordo com Socransky e colaboradores (1998), as bactérias que usualmente estão associadas à DP são especialmente *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Treponema denticola*, *Selenomonas sputigea*, *Eubacterium* spp. e algumas espécies de espiroquetas orais (Socransky *et al.*, 1998; Bascones e Figuro, 2005).

Os microrganismos podem provocar lesões diretas ou indiretas nos tecidos do hospedeiro. As lesões diretas resultam da ação dos fatores de virulência sobre os tecidos, enquanto as lesões indiretas resultam da interação desses fatores com as células de defesa do hospedeiro, conduzindo à liberação de mediadores químicos que vão provocar as lesões, tal como o desgaste ósseo (Siqueira e Rôças, 2007).

## 2.1. ETIOLOGIA DA DOENÇA PERIODONTAL

Segundo Gemell e colaboradores (2007), a DP resulta da interação de mecanismos de defesa do hospedeiro com os microrganismos constituintes do biofilme da placa dentária (Gemell *et al.*, 2007).

A etiologia polimicrobiana da DP envolve um enorme número de espécies bacterianas, fundamentalmente de bactérias anaeróbias estritas e microaerofílicas. A natureza destes agentes patogénicos varia entre as diversas formas clínicas da DP (Tabela I), assim como entre pacientes e até entre diferentes sítios num mesmo doente (Liñares e Martín-Herrero, 2003).

Certos grupos de bactérias de Gram negativo têm sido encontrados de forma consistente em lesões periodontais. Entre as bactérias mais implicadas na patogénese periodontal salientam-se: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Treponema denticola* (Loesche e Grossman, 2001; Kumar *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2005; Kuramitsu *et al.*, 2007). Outras espécies bacterianas, como *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens* exercem um papel de menor relevância, mas ocasionalmente estão associadas com algumas formas de periodontites (Kuramitsu *et al.*, 2007).

Às formas progressivas de periodontites têm sido associadas estirpes de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, com destaque para a *Porphyromonas gingivalis* na patogênese de formas de periodontite rapidamente progressivas (Cutler *et al.*, 1995; Lamont e Jenkison, 2000).

Nas periodontites juvenis, as estirpes bacterianas predominantes são *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Prevotella intermedia* (Darby e Curtis, 2001).

**Tabela I** - Tipos de periodontite e espécies bacterianas predominantes (adaptada de Liñares e Martín-Herrero, 2003).

<b>TIPOS DE PERIODONTITES</b>	<b>ESPÉCIES PREDOMINANTES</b>
Periodontite juvenil localizada	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
Periodontite rapidamente progressiva	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>
Periodontite do adulto	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Tannerella forsythia</i> , <i>Treponema denticola</i>
Periodontite associada ao HIV	<i>Porphyromonas gingivalis</i>

Bactérias de Gram positivo e anaeróbios facultativos, também têm sido implicados em lesões periodontais destrutivas (Darby e Curtis, 2001). Espécies de *Parvimonas*, *Peptococcus* e *Anaerococcus* são comumente isoladas de pacientes com periodontite ou outras infecções orais (Sousa *et al.*, 2013).

As bactérias de Gram positivo anaeróbias constituem um grupo heterogêneo de microrganismos (Murdock, 1998), frequentemente isolados de abscessos e infecções orais periapicais, tais como *Anaerococcus prevotii* e *Parvimonas micra* (Sousa *et al.*, 2013).

Certos grupos de bactérias de Gram negativo, anaeróbias estritas têm sido encontrados de forma consistente em lesões periodontais, em particular os bacilos

---

produtores de pigmento negro, como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (Slots, 1977).

As bactérias do género *Prevotella* fazem parte da flora normal do fluido gengival, mas também encontram-se implicadas em doenças periodontais e noutras infeções orais dos tecidos moles (Yousefi-Mashouf, 1992; Yousefi-Mashouf *et al.*, 1993).

A bactéria da espécie *Prevotella disiens*, não pigmentada, tem sido frequentemente isolada, por métodos convencionais, em pacientes com periodontite crónica (Salari e Kadkhoda, 2004).

### 2.1.1. BACILOS PRODUTORES DE PIGMENTO NEGRO

Os bacilos produtores de pigmento negro são de Gram negativo, anaeróbios estritos, imóveis e não esporulados. Estes microrganismos são de extrema importância nas infeções orais com elevado relevo na patogénese da DP (Paster, 2001).

Foi isolado em 1921, pela primeira vez, de diversos locais e produtos do organismo humano, um bacilo de Gram negativo, anaeróbio estrito e formador de colónias pigmentadas de negro, em meios de cultura de agar-sangue. Oliver e Werry (*cit in* Burdon, 1928) compreenderam que o pigmento negro fosse resultado da produção de melanina e a espécie bacteriana foi então classificada em *Bacterium melaninogenicum*. Esta espécie bacteriana reclassificada de *Bacteroides melaninogenicus* foi, nos anos setenta, subdividida em três subespécies (*B. melaninogenicus* subespécie *melaninogenicus*, *B. melaninogenicus* subespécie *intermedius* e *B. melaninogenicus* subespécie *asaccharolyticus*), com base principalmente, na capacidade de fermentação dos açúcares entre outras características bioquímicas (Shah e Williams, 1987; Shah e Collins, 1988).

Ao longo da década de oitenta, com a evolução da tecnologia laboratorial, foram demonstrados comportamentos heterogéneos nas subespécies do género *Bacteroides* orais, vindo este a perder a maioria das espécies pigmentadas sacarolíticas para o género *Prevotella* e, das espécies pigmentadas assacarolíticas para o género *Porphyromonas*. Para além da caracterização fenotípica, análises ao nível da genética, quimiotaxonomia e sorologia permitiram a diferenciação de várias espécies bacterianas pigmentadas no género *Prevotella* (*P. melaninogenica*, *P. loescheii*, *P. intermedia* e *P. denticola*) e no

---

gênero *Porphyromonas* (*P. asaccharolytica*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis*) (van Winkelhoff *et al.*, 1985; Shah e Collins, 1988, Shah e Collins, 1990).

O diagnóstico presuntivo dos bacilos dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella* relativamente a outros grupos bacterianos de Gram negativo e anaeróbios estritos é realizado de acordo com os parâmetros seguintes: suscetibilidade à Rifampicina (15 mcg) e Kanamicina (1000 mcg), hidrólise de esculina 20% e produção de indol, em que ambos os gêneros respondem de igual forma.

As espécies bacterianas *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, ambas produtoras de pigmento negro, são cocobacilos ou bacilos curtos de Gram negativo, anaeróbios estritos, imóveis, capsulados e não esporulados. A diferenciação das espécies é realizada basicamente através da capacidade de fermentação dos açúcares e atividade enzimática.

Os bacilos *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são reconhecidos como flora normal. *Porphyromonas gingivalis* da microflora de diversos órgãos do organismo humano, com elevada relevância ao nível da cavidade oral, sendo associados à patogênese das infecções orais e, em particular, às periodontais (Slots, 1977).

#### **2.1.1.1. *Porphyromonas gingivalis***

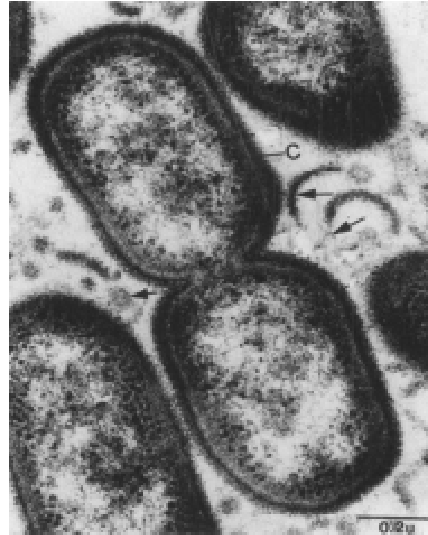
A cavidade oral é o reservatório natural de *Porphyromonas gingivalis*, em particular a região subgingival. No entanto, esta bactéria pode também ser recolhida da placa supragingival, dos sulcos gengivais e das superfícies mucosas orais, em geral.

*Porphyromonas gingivalis* é o agente etiológico de várias patologias, como as gengivites, periodontites, abscessos periapicais e periodontais.

A *Porphyromonas gingivalis* é uma bactéria pertencente à família Bacteroidaceae. Esta bactéria é colonizadora de grande parte das superfícies orais, capaz de invadir as células das mucosas, de libertar toxinas e, está frequentemente associada a diversas formas de periodontites (Mariotti, 1999; Lamont e Jenkison, 2000).

Esta estirpe de morfologia coco-bacilar é de Gram negativo, anaeróbia estrita, imóvel, capsulada (Figura 7), fastidiosa, assacarolítica, dotada de fímbrias adesivas e

produtora de enzimas proteolíticas (proteases) capazes de degradar ou inativar as imunoglobulinas sintetizadas pelo organismo hospedeiro (Amano *et al.*, 1997; Holt *et al.*, 1999).

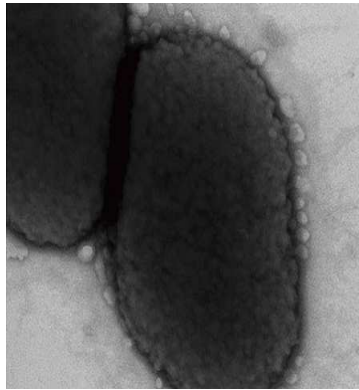


**Figura 7.** Morfologia de *P. gingivalis* – fotografia de microscopia electrónica. (C) cápsula (adaptado de Holt *et al.*, 1999).

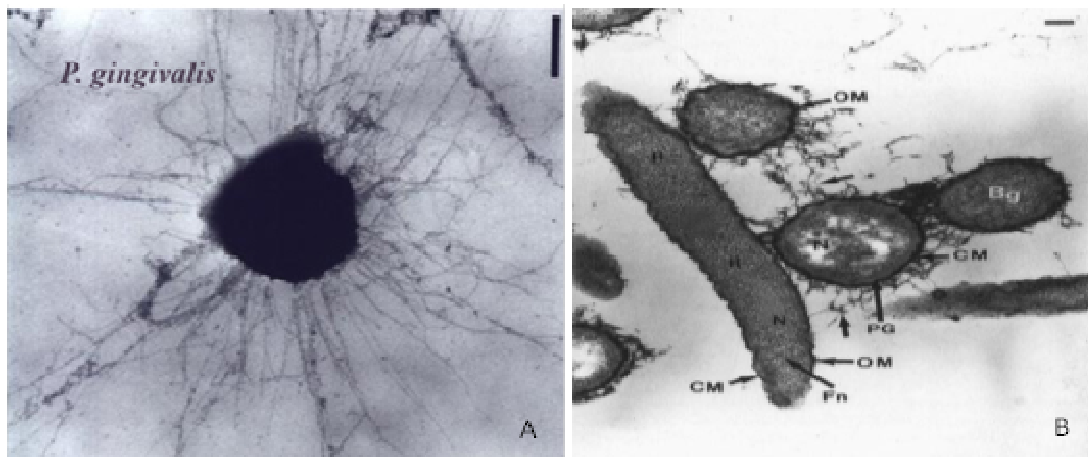
Quando cultivada na superfície do agar de sangue, exhibe colónias de pequeno (1-2 mm) diâmetro, lisas e, inicialmente, de cor creme. Com o tempo (4-8 dias) estas colónias escurecerem do bordo para o centro desde um vermelho escuro até cor negra. A cor escura típica destas colónias é resultado da produção de um protoheme, pigmento de cor negra, devido à utilização metabólica de determinados componentes do meio de cultura.

*P. gingivalis* possui diversas características químico-biológicas que a tornam um importante membro da microbiota subgingival na doença periodontal e não só possui, como também, produz numerosos fatores de virulência de grande toxicidade para o hospedeiro.

A patogenicidade *P. gingivalis* deriva, numa primeira fase, da sua capacidade de adesão às estruturas celulares do hospedeiro. Esta característica é um factor de virulência essencial para a colonização da bactéria, sendo efetiva pela existência de elementos estruturais, como as fimbrias, lipopolissacarídeos (LPS), cápsula, vesículas superficiais (Figura 8), e bioquímicos como metabolitos e enzimas (Goulbourne e Ellen, 1991).



**Figura 8.** Vesículas de *P.gingivalis* (adaptado de Olsen e Amano, 2015).



**Figura 9.** Fimbrias de *P. gingivalis* (A) (adaptado de Hamada *et al.*, 1996); Co-agregação bacteriana entre *P.gingivalis* (PG) e *Fusobacterium nucleatum* (Fn) (B) (adaptado de Holt *et al.*, 1999).

As fimbrias (Figura 9.A) são estruturas proteicas longas e delgadas que surgem a partir da membrana externa do microrganismo. Estes componentes bacterianos não só participam nas interações entre a bactéria e o hospedeiro, como entre eles e outros microrganismos (Figura 9 B) (Hamada *et al.*, 1996). A aderência bacteriana às superfícies mucosas e às estruturas dentárias, assim como a co-agregação microbiana (Figura 9 B) e capacidade de hemoaglutinação, são determinantes críticos para a colonização efetiva e progressão da infecção (Holt *et al.*, 1999).

Outros constituintes da superfície bacteriana associados à aderência incluem os LPS e a cápsula (Saglie *et al.*, 1986). Quanto aos LPS produzidos pela *P. gingivalis*,

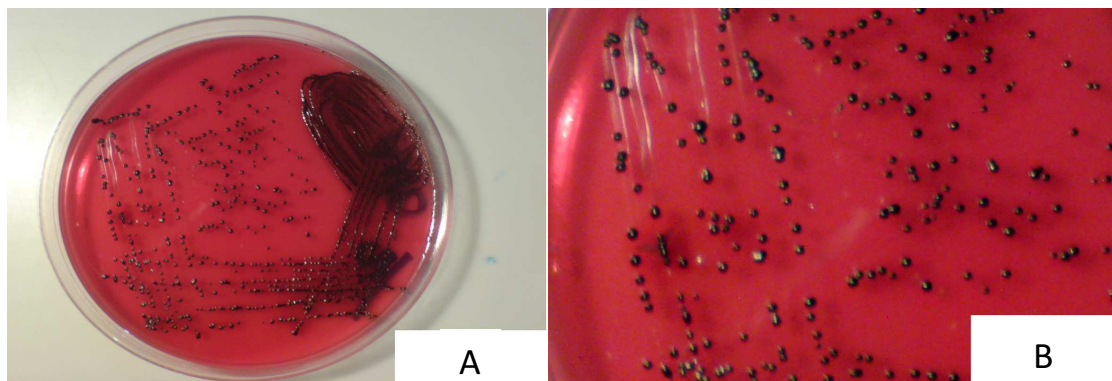
este difere quimicamente de outros LPS bacterianos e revela uma importante baixa endotoxicidade, o que explica a elevada capacidade desta bactéria em escapar aos processos de defesa do hospedeiro. Na verdade, *P. gingivalis* desenvolveu mecanismos sofisticados na forma de contornar as defesas do hospedeiro, por exemplo, em resposta à reação inflamatória do hospedeiro, a *P. gingivalis* exibe uma cápsula extracelular que impossibilita a fagocitose pelas células leucocitárias do hospedeiro (Okuda *et al.*, 1986; Sundqvist *et al.*, 1991).

A resposta imunológica inata do hospedeiro limita a propagação da infiltração das bactérias invasoras para tecidos mais profundos, de forma a manter a integridade da barreira epitelial (Hung *et al.*, 2013). As células epiteliais das mucosas do hospedeiro criam não só barreiras físicas, como químicas, pois segregam citocinas inflamatórias e quimiocinas em resposta à infecção após o reconhecimento de produtos microbianos por proteínas receptoras (Hornef e Bogdan, 2005). No entanto, *P. gingivalis* possui capacidade para se infiltrar no epitélio da mucosa oral e destruir integralmente esta barreira tornando viável a sua proliferação em tecidos mais profundos, nas bolsas periodontais (Saglio *et al.*, 1986; Goulbourne e Ellen, 1991). Mais tarde, esta capacidade de invasão celular foi apresentada em culturas primárias de células epiteliais da gengiva (Lamont *et al.*, 1992) e em células do epitélio estratificado de bolsa periodontal humana (Sandros *et al.*, 1994). De entre as características de virulência desta estirpe, potencialmente significativas na invasão dos tecidos do hospedeiro, destacam-se as enzimas proteolíticas, hidrolíticas e lipolíticas produzidas pela *P. gingivalis* (Kuramitsu *et al.*, 1995; Travis *et al.*, 1997). Muitas destas enzimas estão expostas à superfície da membrana bacteriana e contactam diretamente com as células hospedeiras. Por exemplo, as enzimas peptidases (glicilpropildipeptidil-aminopeptidase, glicilpropilpeptidase) contribuem de forma significativa na progressão da doença periodontal, que por destruição das células eucarióticas permitem a invasão conjunta de outras espécies bacterianas para tecidos mais profundos do organismo hospedeiro (Sundqvist, 1993; Kuramitsu *et al.*, 1995; Travis *et al.*, 1997). Ainda no grupo das enzimas proteolíticas, salientam-se a colagenase e a hialuronidase que facilitam a invasão bacteriana, hidrolisando as fibras de colagénio e o ácido hialurónico dos tecidos conjuntivos da mucosa oral (Bourgeau *et al.*, 1992).

Outros fatores de virulência da *P. gingivalis* são os produtos do seu metabolismo, designadamente o indol, amoníaco e ácido sulfídrico. Facilitando a

colonização dos tecidos mais profundos do hospedeiro, esta estirpe bacteriana produz, ainda substâncias inibitórias da quimiotaxia dos leucócitos polimorfonucleares e da proliferação dos fibroblastos.

A pigmentação escura característica das colônias de *P. gingivalis* (Figura 10) resulta da sua capacidade em armazenar hemina na superfície celular (Shah *et al.*, 1979). Este mecanismo de armazenamento de hemina proporciona uma vantagem nutricional para a sobrevivência deste patógeno num ambiente limitado de ferro, como é o caso das bolsas periodontais. As condições ambientais numa bolsa periodontal no decurso de uma infeção não são perfeitamente conhecidas, no entanto, um elevado número de hemácias são normalmente encontradas em lesões periodontais (Mukherjee, 1985).



**Figura 10.** Cultura de *Porphyromonas gingivalis* (A), onde é evidenciado o pigmento negro (B) (adaptado de Shabbir *et al.*, 2016).

*P. gingivalis* adquire a hemina através da ação da hemolisina que, pela lise das hemácias, não só liberta a hemina como disponibiliza o ião ferroso (Chu *et al.*, 1991).

De forma esquemática os fatores de virulência da *P. gingivalis* estão indicados na Tabela II.

**Tabela II** - Fatores de virulência de *Porphyromonas gingivalis* (adaptado de Zambon e Nisengard, 2007).

---

<b>Componentes de colonização:</b>	Fimbrias
	Cápsula

---

<b>Componentes enzimáticos:</b>	- Superóxido dismutase
	- Fosfatase ácida
	- Fosfatase alcalina
	- Colagenases (tipo I e tipo IV)
	- Elastase
	- Gelatinase
	- Tipo “tripsina”
	- IgA- e IgG-proteases

---

<b>Metabólitos tóxicos:</b>	- Endotoxina
	- Toxina epitelial
	- Inibidores fibroblásticos
	- Indol
	- Reabsorção óssea pelo LPS

---

### 2.1.1.2. *Prevotella intermedia*

Pertencente à família Bacteroidaceae, a *Prevotella intermedia* é uma espécie bacteriana que pertence ao género *Prevotella* e ao grupo de *Prevotella* pigmentada, anteriormente caracterizada de *Bacteroides melaninogenicus intermedius*. Os membros desta espécie são cocobacilos de Gram negativo, anaeróbios estritos, não esporulados e imóveis. Nutricionalmente exigentes requerem hemina e vitamina K para o seu crescimento e fermentam os açúcares (glicose e sacarose) para obtenção de carbono e energia. Dentro das suas características bioquímicas, *Prevotella intermedia* é produtora de indol e responde negativamente ao teste da catalase (Frandsen, *et al*, 1995).

Nas culturas de agar de sangue enriquecido, as colónias de *Prevotella intermedia* são convexas, lisas, secas e exibem  $\alpha$ -hemólise. Estas colónias exibem cor escura, devido à produção de pigmento negro, semelhante a *Porphyromonas gingivalis* (Figura

9). Contrariamente às colónias da *P. gingivalis*, estas exibem cor avermelhada sob incidência da luz ultravioleta - UV - (365 nm).

*Prevotella intermedia* coloniza os sulcos gengivais e associa-se a diferentes infeções periodontais agressivas. Esta estirpe bacteriana prolifera nas bolsas periodontais onde coexiste com outros microrganismos, constituindo uma microbiota oral.

De modo análogo à *P. gingivalis*, esta espécie bacteriana elabora um diversificado número de fatores de virulência que vão desde as fimbrias e adesinas que permitem a sua aderência às células hospedeiras e uma cápsula polissacarídea que lhe proporciona resistência à atividade fagocítica das células de defesa do hospedeiro. Detém ainda atividade fibrinolítica, inibitória da produção de linfócitos B e da síntese de anticorpos e capacidade de degradação das imunoglobulinas através das IgA- e IgG-proteases (Paster *et al.*, 2001).

De forma esquemática os fatores de virulência da *Prevotella intermedia* estão indicados na seguinte Tabela III.

**Tabela III** - Fatores de virulência da *Prevotella intermedia* (adaptado de Zambon e Nisengard, 2007).

<b>Componentes de colonização:</b>	- Fimbrias	+
	- Cápsula	+
<b>Componentes enzimáticos:</b>	- Superóxido dismutase	+
	- Fosfatase ácida	+
	- Fosfatase alcalina	+
	- Gelatinase	+/-
	- Tipo “tripsina”	+
	- IgA- e IgG-proteases	+
<b>Metabolitos tóxicos:</b>	- Endotoxina	+/-
	- Toxina epitelial	+
	- Inibidores fibroblásticos	+
	- Indol	+
	- Reabsorção óssea pelo LPS	+

## 2.2. TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL

A prevenção e controlo das doenças periodontais, em particular das periodontites, dependem fundamentalmente da eliminação e controlo do biofilme microbiano (placa bacteriana), através de hábitos de higiene oral e de tratamento mecânico local.

O tratamento da DP na fase inicial consiste fundamentalmente, numa ação mecânica de raspagem (eliminação de cálculo) e alisamento radicular (remoção de depósitos supra e subgingivais da placa bacteriana) e, como adjuvante o uso de antiséptico. Nos estágios mais avançados da doença há, por vezes, necessidade de drenagem cirúrgica, que inclui desbridamento do tecido necrótico que, com a drenagem do pus, alivia a obstrução e conseqüente aumento de oxigenação dos tecidos mais profundos. Todavia, em determinados tipos de periodontites, em particular na periodontite agressiva, torna-se necessário associar uma terapêutica antimicrobiana (Loesche e Grossman, 2001).

Os métodos químicos de controlo da placa bacteriana são normalmente utilizados como complementares dos métodos mecânicos.

O controlo da placa bacteriana é conseguido clinicamente através da combinação de certos compostos antimicrobianos químicos com medidas terapêuticas convencionais, quer por via tópica (antisépticos), quer por via sistémica (antibióticos).

### 2.2.1. USO DE ANTISÉPTICOS NA DP

Dentro dos diversos compostos químicos que atuam como antisépticos no controlo quantitativo e qualitativo da placa bacteriana, salientam-se a clorhexidina, compostos fenólicos, compostos de amónio quaternário, agentes oxigenados, entre outros (Eley, 1999; Cecchin *et al.*, 2011).

A clorhexidina é o antiséptico de eleição, de uso tópico com amplo espectro de ação sobre bactérias de Gram positivo ou de Gram negativo, fungos e leveduras. Esta

atividade relaciona-se com a adsorção da clorhexidina à superfície da parede celular das bactérias provocando alterações das barreiras de permeabilidade das suas membranas citoplasmáticas e capacidade de penetração nas células bacterianas. Manifesta, dependendo da concentração usada, uma atividade bacteriostática (em concentrações de 0,02% - 0,06%) ou bactericida quando utilizada em concentrações compreendidas entre 0,12% e 0,20% (Carrilho *et al.*, 2010; Sabatini e Pashley, 2014). A película adquirida, ao possuir na sua composição uma grande quantidade de glicoproteínas salivares adsorvidas, liga-se à clorhexidina e deste modo inviabiliza uma posterior aderência das bactérias. A clorhexidina está indicada como complemento terapêutico no controlo de inflamações da mucosa gengival, mas não em patologias periodontais, devido à sua incapacidade de penetração da mucosa oral (Herrera *et al.*, 2001; Bascones e Morante, 2006).

### 2.2.2. USO DE ANTIBIÓTICOS NA DP

O emprego de fármacos antimicrobianos como coadjuvantes no tratamento das doenças periodontais pode ser um benefício adicional, desde que haja indicações precisas e uma correta seleção do fármaco (Haffajee *et al.*, 2007; Herrera *et al.*, 2012). A terapêutica empírica vulgarmente usada no tratamento das infeções periodontais, deverá ser instituída com um antibiótico ou associação de antibióticos, cujo espectro de atividade inclua apenas o(s) microrganismo(s) suspeito(s) de ser responsável pela infeção da cavidade oral, em particular, a infeção periodontal. O perfil do doente, a gravidade da infeção e a existência de co-morbilidade são parâmetros significativos a considerar, assim como o local da infeção e o padrão de suscetibilidade aos antibióticos do ou dos agentes etiológicos mais presumivelmente implicados pela infeção em causa. Não é demais repetir que a eficácia do tratamento antimicrobiano é dependente do rigor do diagnóstico e de uma antibioticoterapia adequada.

A principal ação dos agentes antimicrobianos consiste em limitar a propagação de uma infeção local e/ou sistémica. Tendo em conta que, como indicado na literatura, a duração da antibioterapia é dependente do tipo de infeção, do local orgânico, da sua extensão e sem dúvida, do antibiótico escolhido.

A sensibilidade aos antimicrobianos dos periodontopatogénios é cada vez menor e tem sido demonstrada em diversos estudos, uma clara tendência para a resistência

---

farmacológica em certas espécies dos géneros de *Prevotella* e de *Porphyromonas* (Aldridge *et al.*, 2001; Chan e Chan, 2003; Genco *et al.*, 2003).

A componente polimicrobiana das infeções odontológicas em geral e das periodontais em especial, faz com que em muitos casos seja necessário recorrer a uma combinação de antibióticos para se obter um maior espetro de ação e mais adequado ao tipo de infeção (Liñares e Martín-Herrero, 2003). Dentro da grande variedade de agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de periodontites ou de infeções mistas da cavidade oral, destacam-se: a amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, cefalosporinas, doxiciclina, metronidazol, clindamicina e os macrólidos (Maestre, 2002; Bascones *et al.*, 2004; Brook, 2007).

Historicamente, as penicilinas foram os primeiros "verdadeiros antibióticos" a serem introduzidos na prática clínica e prosseguem, ainda hoje, esse importante desempenho na terapêutica das infeções bacterianas. O grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (como as penicilinas, ampicilinas e amoxicilinas) tem atividade bactericida e atua na inibição da síntese da parede bacteriana e consequentemente, na ativação do sistema autolítico endógeno das bactérias, orientando a lise da membrana das células bacterianas. Todavia, nas últimas duas décadas, estes agentes antimicrobianos têm sido afastados, devido ao aumento de resistências associadas ao aumento do número de bactérias capazes de produzirem enzimas anti- $\beta$ -lactâmicos, isto é, enzimas capazes de inativarem os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Legg e Wilson, 1990; Sousa, 2005). A associação de uma penicilina com um agente inibidor de  $\beta$ -lactamases, por exemplo, amoxicilina + ácido clavulânico, restabelece o lugar de primeira escolha e a atividade contra bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases (Maestre, 2002).

No tratamento das infeções mistas causadas por bactérias anaeróbias estritas são usados fármacos do grupo dos nitroimidazóis (metronidazol), macrólidos, lincosamidas e tetraciclinas (Sousa, 2005; Van Winkelhoff *et al.*, 2005; Pumbwe *et al.*, 2007).

O metronidazol é antibiótico inibidor da síntese dos ácidos nucleicos. Este antibiótico é reduzido no interior da bactéria, tendo como consequência a formação de compostos que interferem com o ADN bacteriano e impedem a sua síntese. Como consequência, é considerado bactericida (Sousa, 2005). Tem sido demonstrado elevada eficácia do metronidazol frente aos anaeróbios de Gram negativo e espiroquetas (Gaetti-

Jardim *et al.*, 2007; Wybo *et al.*, 2007). Para um espectro mais alargado, existe vantagem na utilização da associação sinérgica do metronidazol com macrólidos ou com  $\beta$ -lactâmicos (Sousa, 2005; Pumbwe *et al.*, 2007).

Os macrólidos e as lincosamidas são antibióticos inibidores da síntese proteica. A sua ação consiste na ligação à subunidade 50S dos ribossomas bacterianos, impedindo a translocação. São ambos antibióticos bacteriostáticos (Sousa, 2005). Dentro do grupo das lincosaminas, destaca-se a clindamicina, sendo referido como um antibiótico com boa penetração no fluido gengival (Walker *et al.*, 1981; Rush *et al.*, 2007) e, pelos dados baseados no teste suscetibilidade *in vitro*, é eficaz contra a maioria dos patógenos periodontais. Na literatura encontram-se estudos que apontam a clindamicina como eficiente no tratamento de periodontites refratárias de adulto (Walker e Gordon, 1990; Gordon *et al.*, 1990; Rush *et al.*, 2007). A clindamicina atinge a flora bacteriana de Gram negativo caracterizada pela presença de *Bacteroides* de pigmento negro como a *Prevotella intermedia* e a *Porphyromonas gingivalis*.

As lincosaminas, em particular, a clindamicina, permanecem como fármacos de eleição no tratamento de infeções odontológicas pela sua alta eficácia para a maioria dos microrganismos anaeróbios (Rush *et al.*, 2007).

As tetraciclinas são outro grupo de antimicrobianos de segunda escolha, prescrito com resultados satisfatórios, tanto ao nível tópico como sistémico, pois oferecem um alargado espectro de ação sobre os microrganismos orais, tanto para bactérias de Gram positivo como de Gram negativo (Lancaster *et al.*, 2003; Paiva *et al.*, 2003). No entanto, o seu uso na automedicação tem contribuído para o desenvolvimento de uma certa resistência às tetraciclinas, codificada pelos genes *tet*. Porém, os microrganismos anaeróbios de Gram negativo são geralmente sensíveis às tetraciclinas (Lakhssassi *et al.*, 2005; Sousa, 2005).

### 2.3. RESISTÊNCIAS BACTERIANAS AOS ANTIBIÓTICOS $\beta$ -LACTÂMICOS

Atualmente, ainda uma vasta maioria de doenças infecciosas é tratada eficazmente com os antibióticos disponíveis no mercado. No entanto, a resistência aos antimicrobianos dos microrganismos anaeróbios estritos e facultativos tem aumentado significativamente, nas últimas décadas.

A resistência bacteriana pode ser considerada um fenómeno ecológico natural que ocorre como resposta do microrganismo frente ao vasto uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (Levy, 2002). As bactérias proliferam rapidamente, sofrem mutações e podem trocar material genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies diferentes. São microrganismos de elevada capacidade de adaptação a diversos fatores desfavoráveis, como a exposição a agentes antimicrobianos (Levy, 2002; Prabhavathi, 2006).

As resistências bacterianas podem ser adquiridas. Este tipo de resistência é demonstrado, por exemplo, pela síntese de enzimas que inativam o antibiótico ou pela alteração da permeabilidade da parede celular bacteriana, não permitindo a penetração do antimicrobiano (Sousa, 2005).

Sabe-se hoje que as bactérias constituintes de um biofilme são muito mais resistentes a um antibiótico, do que os mesmos microrganismos no estado planctónico, devido à proteção da matriz extracelular, co-agregação bacteriana, aumento do número de mutações, desenvolvimento de mecanismos regulados por “*quorum-sensing*”, entre outros (Hoiby *et al.*, 2010).

O conhecimento da suscetibilidade dos isolados periodontais aos antimicrobianos é de enorme relevância na prática clínica, não só na escolha do antibiótico para o tratamento, mas também na profilaxia de eventuais infeções locais ou sistémicas que possam advir após procedimentos cirúrgicos ou outros na cavidade oral.

A capacidade de certos microrganismos produzirem enzimas  $\beta$ -lactamases é, sem dúvida, uma condição determinante para a perda de eficácia dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

### 2.3.1. AS $\beta$ -LACTAMASES NA CAVIDADE ORAL

A produção de  $\beta$ -lactamases por bactérias de Gram negativo é um dos mecanismos mais comuns de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. As enzimas  $\beta$ -lactamases inativam os agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos por hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, por quebra da ligação amida da estrutura química dos referentes fármacos (Williams, 1999; Poole, 2004). Estas enzimas podem ser produzidas nas bolsas periodontais por patogénios específicos ou por microrganismos da flora

subgingival (Kinder *et al.*, 1986; Blandino *et al.*, 2007; Maestre *et al.*, 2007; Ardila *et al.*, 2010). Estes estudos demonstraram que as  $\beta$ -lactamases podem ser produzidas por uma pequena percentagem da flora subgingival nativa e, uma vez libertadas para o fluido gengival, vão destruir agentes antimicrobianos, tais como penicilina, ampicilina e amoxicilina. De modo que, as  $\beta$ -lactamases produzidas por estes microrganismos irão proteger outros microrganismos da flora subgingival que são susceptíveis, *in vitro*, e que teriam sido eliminados na presença de compostos  $\beta$ -lactâmicos. Por outro lado, a incidência de  $\beta$ -lactamases é elevada nas bolsas periodontais profundas (Walker, 2000).

As enzimas  $\beta$ -lactamases têm sido identificadas em microrganismos anaeróbios estritos nas espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, *Prevotella spp.*, *Porphyromonas spp.*, *Fusobacterium spp* entre outras (Summanen *et al.*, 1993; Könönen *et al.*, 1998; Blandino *et al.*, 2007; Ardila *et al.*, 2010).

Vários estudos têm demonstrado a presença de espécies bacterianas produtoras de enzimas de  $\beta$ -lactamases em elevada percentagem de pacientes com periodontites (Herrera *et al.*, 2000; van Winkelhoff *et al.*, 1997). As estirpes bacterianas produtoras de  $\beta$ -lactamases da microflora subgingival que pertencem ao género *Prevotella* são na maioria dos casos: *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *P. melaninogenica* (van Winkelhoff *et al.*, 1997; Kuriyama *et al.*, 2001; Blandino *et al.*, 2007; Ardila *et al.*, 2010).

Determinantes de resistência às penicilinas e cefalosporinas têm sido observados em microrganismos da cavidade oral, com especial relevo para *Porphyromonas spp* e *Prevotella spp* pela produção de  $\beta$ -lactamases (Kuriyama *et al.*, 2001; Aldridge *et al.*, 2001; Genco *et al.*, 2003). Daí que, a antibioterapia de rotina das infeções odontológicas, particularmente das periodontites, consista numa associação de penicilinas com compostos inibidores das  $\beta$ -lactamases, de modo a possibilitar o alargamento do espectro de atividade dos antimicrobianos utilizados.

Os principais inibidores das  $\beta$ -lactamases são o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. Estas associações podem ser particularmente úteis no tratamento de infeções polimicrobianas causadas por bactérias aeróbias, como por anaeróbias Gram positivo ou Gram negativo (Brook, 2016).

## 2.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

### 2.4.1. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA

Atualmente, a identificação microbiana baseia-se fundamentalmente, em dois tipos distintos de procedimentos laboratoriais: a metodologia clássica cuja identificação é realizada através de colorações de Gram, testes enzimáticos e provas bioquímicas (API's) e metodologias de biologia molecular, como o método da *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Os métodos convencionais (clássicos) para a identificação de microrganismos anaeróbios são tecnicamente complexos, dispendiosos e geralmente morosos (Song, 2005). Baseiam-se em técnicas de crescimento e isolamento de agentes patogênicos em meios de cultura (Genco *et al.*, 1985; Lu *et al.*, 1994; Mooney e Kinane, 1994; Hidalgo *et al.*, 1998).

Os métodos moleculares, em particular a PCR, são procedimentos de identificação que se baseiam na detecção de sequências de ADN, nomeadamente de espécies bacterianas de difícil ou nulo crescimento em meios de cultura, ou mesmo se presentes em baixo número na amostra colhida (Siqueira Jr. e Rôças, 2004). Comparativamente aos métodos clássicos, a PCR é adjetivada de grande sensibilidade, especificidade e rapidez (Pitt e Saunders, 2000; Song, 2005).

As técnicas de biologia molecular são indicadas como meios de diagnóstico laboratorial fundamentais na prevenção e tratamento das mais variadas patologias orais, como cáries, periodontites e infeções endodônticas (Santos *et al.*, 2004).

Através da técnica da PCR é possível conseguir a amplificação de um fragmento de ADN proveniente de uma única célula. Este processo consiste em repetidos ciclos de síntese de ADN, através da escolha adequada de dois oligonucleotídeos sintéticos (*primers*) com orientações opostas e com sequências complementares às extremidades da sequência alvo. A reação decorre mediante a ação de uma ADN polimerase resistente a variações de temperatura. Cada ciclo da reação de amplificação envolve três etapas distintas: (1) desnaturação (separação das hélices do ADN a ser amplificado), (2) emparelhamento dos oligonucleotídeos (ligação complementar entre os *primers* e o ADN a ser amplificado) e (3) extensão (síntese do ADN pela ADN polimerase). A orientação

dos *primers* faz com que a síntese de ADN ocorra na zona interna entre eles, assim o produto da extensão de um ciclo de PCR é utilizado como substrato para o ciclo seguinte, de modo que em cada ciclo resulta a duplicação da quantidade de ADN existente. Desta forma, o número de cópias do fragmento alvo tem um aumento exponencial ( $2^n$ ) (Mullis e Faloona, 1987).

Estudos recentes, utilizando sistemas moleculares de identificação bacteriana têm revelado a presença e identidade de microrganismos em casos de insucessos de tratamento endodôntico (Siqueira e Rôças, 2004). Também, através da PCR a *Porphyromonas gingivalis* foi identificada com elevada prevalência em infecções de origem endodôntica (Pitt e Saunders, 2000).

Em 2005, Gomes e colaboradores realizaram um estudo com 50 dentes com polpas necróticas não tratadas (infecção primária) e 50 dentes com falha de tratamento endodôntico (infecção secundária). Técnicas de cultura e PCR identificaram bactérias produtoras de pigmento negro em 13% e 50% dos dentes em estudo, respetivamente. *P. gingivalis* foi raramente isolada por métodos de cultura (1%), mas foi a espécie mais frequentemente identificada por PCR (38%). Da mesma forma, *P. endodontalis* não foi recuperada pelos métodos convencionais a partir de qualquer dente estudado, mas foi detetada por PCR em 25% dos dentes em estudo. Os resultados mostram ainda maiores taxas de identificação de *P. intermedia* (33%) e *P. nigrescens* (22%) através da análise por PCR, comparativamente com o processo de cultura (13%) (Gomes *et al.*, 2005).

Concluindo, a técnica da PCR, além de rápida, apresenta a vantagem de necessitar de quantidade mínima de amostra, mesmo de células não viáveis, para identificação, o que, associada a sua elevada especificidade, representa um enorme potencial no diagnóstico das infecções endodônticas e nas infecções em geral.

#### 2.4.2. MÉTODOS DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O estudo da sensibilidade das estirpes bacterianas é de relevante significado dado ao aumento gradual de resistência frente aos antimicrobianos disponíveis. Esta resistência é mais comum no género *Prevotella*, do que no género *Porphyromonas*.

Das diversas metodologias disponíveis, o método de difusão do disco não é considerado adequado pelo Comitê Nacional para Laboratórios Clínicos dos EUA (NCCLS) para estudo da sensibilidade das bactérias anaeróbias estritas. O NCCLS recomenda o método de diluição em agar com a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), ou um método alternativo mais prático, mas mais dispendioso, que consiste na determinação da sensibilidade utilizando tiras impregnadas com um gradiente de concentração de antimicrobianos, conhecido pelo método do E test®. A sensibilidade antimicrobiana é interpretada nos dois métodos seguindo as tabelas publicadas pelo NCCLS e existe uma boa correlação nos resultados obtidos em ambas as metodologias referidas (NCCLS, 1997; Murray *et al.*, 1999).

Os antimicrobianos com maior atividade *in vitro* e *in vivo* frente às bactérias anaeróbias estritas, são: penicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, clindamicina, tetraciclina e metronidazol (NCCLS, 1997).

## OBJETIVOS

Face à restrita informação acerca da identidade de estirpes bacterianas pigmentadas anaeróbias estritas em infeções periodontais em Portugal, e eventuais resistências desenvolvidas, foram propostos os seguintes objetivos:

(a) Pesquisa das estirpes bacterianas produtoras de pigmento negro, em particular *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, implicadas frequentemente, na doença periodontal (DP);

(b) Pesquisa da suscetibilidade antimicrobiana, principalmente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e ainda, ao metronidazol, clindamicina e tetraciclina prescritos usualmente em Portugal no tratamento de infeções em odontologia;

(c) Deteção de enzimas  $\beta$ -lactamases pelas bactérias identificadas no estudo.

O conhecimento de eventuais resistências poderá auxiliar na compreensão de fenómenos relacionados com a dificuldade na erradicação de determinadas infeções periodontais e ainda, contribuir para uma maior sensibilização na seleção e no uso do antibiótico, em particular, na terapia odontológica.



## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. AMOSTRAGEM

O estudo laboratorial teve como suporte uma coleção de isolados subgingivais provenientes de amostras de pacientes da Clínica Dentária da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa (UFP), Porto, no período compreendido entre 2008-2010. Foram analisadas 42 amostras clínicas de pacientes com periodontites, com idades entre os 35-75 anos. Estes pacientes estavam isentos de qualquer tratamento antimicrobiano.

As amostras clínicas foram colhidas por profissionais de medicina dentária, de zonas profundas das bolsas periodontais com auxílio de pontas de papel absorvente e estéril, nº 30 (Dentsply Dental Co. Ltd., Tianjin, China). Por cada paciente, foram colhidas amostras em 4-6 pontas e, imediatamente transferidas para frascos com 2 mL de meio (fluido) de transporte reduzido estéril (RTF). De seguida, as amostras foram processadas no Laboratório de Microbiologia Clínica, CEBIMED - UFP.

### 2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

No laboratório, a preparação das amostras em RTF iniciou-se com uma homogeneização suave, em vortex, durante 30 segundos. Após a dispersão mecânica, as amostras foram submetidas ao método das diluições decimais, em solução tampão, phosphate buffered saline (PBS) esterilizado, até à obtenção final da diluição  $10^{-4}$ . Os meios de cultura foram inoculados pelo método de espalhamento (*spread plate*) com 100  $\mu$ L das amostras diluídas, em ambiente asséptico, em duplicado. Para o crescimento das bactérias anaeróbias presentes nas amostras foram utilizadas placas de Petri com geloses estéreis de Columbia agar base (Merk) enriquecida com 5% de sangue de cavalo desfibrinado (SR0050, Oxoid), 5  $\mu$ g/mL hemina (Fluka) e 1  $\mu$ g/mL menadiona (Sigma). As placas semeadas foram colocadas em jarras de anaerobiose e incubadas por 7-14 dias, a 37° C, sob um sistema de controlo automático, gerador de atmosfera anaeróbia, MACSmics Anaerobic and Microaerophilic Jar Gassing System, Don Whitley Scientific Limited, Reino Unido (Figura 11).



**Figura 11.** Sistema automático gerador de atmosfera anaeróbia, acoplado a jarra de anaerobiose.

O controlo da atmosfera anaeróbia foi conseguido com o cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* (bactéria aeróbia estrita) em meio de citrato de Simmons. Entre os 7-14 dias de incubação, as culturas foram observadas e as colónias suspeitas, com pigmentação negra, foram repicadas para novas placas de Petri com o mesmo meio de cultura e incubadas novamente, nas mesmas condições ambientais anteriores, durante 7 dias.

Após este período de incubação, as culturas apresentavam-se puras e com colónias negras, isoladas e perfeitamente definidas, como se pode observar na Figura 12.



**Figura 12.** Cultura pura com colónias negras, isoladas e definidas.

Aos isolados foram efetuados testes primários de identificação presuntiva, que incluíram, a coloração de Gram e o teste da catalase.

Para todas as amostras clínicas, as culturas bacterianas foram processadas em duplicado, em ambiente asséptico, e as precauções usuais de manipulação de agentes patogénicos foram respeitadas ao longo de todo o processamento laboratorial, de acordo com as diretivas aconselhadas pela CLSI/NCCLS M29-A.

### 3. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS COM PIGMENTAÇÃO NEGRA

#### 3.1. METODOLOGIA CLÁSSICA

Os isolados foram identificados bioquimicamente por sistemas automáticos de Rapid ID 32A (bioMérieux<sup>®</sup> SA, Marcy l'Etoile, França) (Figura 13), seguindo todas as instruções técnicas de procedimento e leitura do respetivo *Analytical Profile Index* (API).



**Figura 13.** Exemplo de uma galeria de ID32A utilizada para a identificação bioquímica das bactérias isoladas.

Após identificação das amostras por este método, estas foram armazenadas em TSB / 20% glicerol, a -80°C, para posterior identificação por PCR.

## 3.2. METODOLOGIA MOLECULAR

### 3.2.1. EXTRAÇÃO DO ADN BACTERIANO

De cada uma das amostras isoladas e congeladas em TSB/ 20% glicerol, retirou-se 500 µL e centrifugou-se a 6.000 rpm, durante 10 minutos. Das culturas bacterianas frescas e puras foram repicadas 4-6 colónias e suspenderam-se em 500 µL de água ultra-pura estéril em eppendorf estéril e centrifugou-se a 6.000 rpm, durante 10 minutos. Após centrifugação, os sedimentos de bactérias foram ressuspensos em 200 µL de água ultra-pura. As suspensões foram então colocadas em banho de água a 100°C, durante 10 minutos. Após fervura, seguiu-se uma centrifugação a 12.000 rpm, durante 10 minutos e cada um dos sedimentos resultantes foram ressuspensos em 200 µL de água ultra-pura estéril.

### 3.2.2. AMPLIFICAÇÃO DO ADN BACTERIANO

Todos os isolados bacterianos foram caracterizados através de PCR. Para as amplificações foram usados pares de *primers* específicos, Pi1 e Pi2 para *P. intermedia* e, Pg1 e Pg2 para a *P. gingivalis*. Os tipos de *primers* usados estão indicados na Tabela IV.

**Tabela IV.** Sequência dos oligonucleóticos utilizados para caracterização das amostras por PCR.

<i>Primers</i>	Sequência de bases do <i>primer</i>	Nº de bases
<b>Pi<sub>1</sub></b>	5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG-3'	21
<b>Pi<sub>2</sub></b>	5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GGGT-3'	22
<b>Pg<sub>1</sub></b>	5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3'	20
<b>Pg<sub>2</sub></b>	5'-AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG-3'	21

Para as amplificações das amostras de ADN foram usados reagentes da Promega Corporation, Madison, EUA.

A preparação das reações de PCR foi realizada em sala específica para o efeito, de modo a evitar possíveis contaminações. Nos ensaios efetuados foram usados tubos SmartCycler/LC estéreis. Para cada microtubo, previamente identificado, foram pipetados os reagentes indicados na Tabela V.

**Tabela V.** Mistura dos reagentes necessários para a reação de PCR.

Reagentes	Volume Final	Concentração Final
5x Green GoTaq <sup>®</sup> Flexi Buffer	5,0 µL	1x
Solução de MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	2,5 µL	2,5 mM
dNTP (10mM)	1,0 µL	0,25 mM
Primer Pi <sub>1</sub> ou Pg <sub>1</sub>	1,0 µL	0,4 µM
Primer Pi <sub>2</sub> ou Pg <sub>2</sub>	1,0 µL	0,4 µM
GoTaq <sup>®</sup> Flexi DNA Polymerase (5u/µL)	0,2 µL	1 µL
Água ultra-pura estéril	9,3 µL	_____
Amostra de ADN em análise	5,0 µL	_____

Em simultâneo, foram também preparados tubos controlo positivo e negativo, sendo que ao controlo negativo se adicionou 5 µL de água ultra-pura estéril e aos controlos positivos Pi e Pg, pipetaram-se 5 µL de ADN da estirpe-padrão de *P. intermedia* e de *P. gingivalis*, respetivamente.

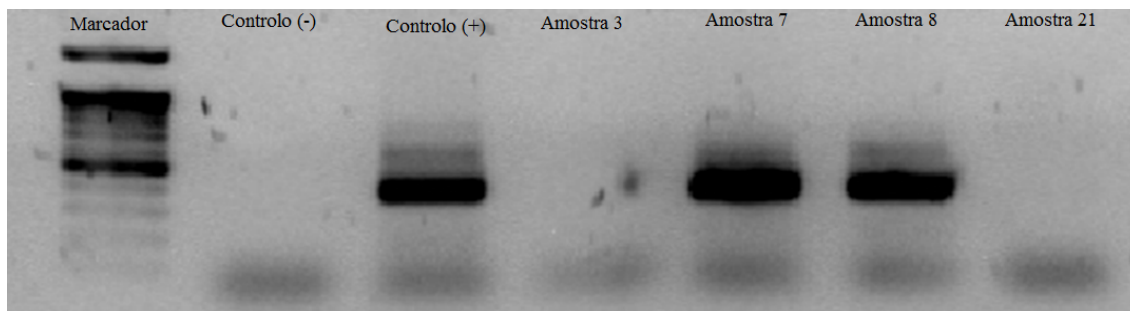
As reações de amplificação foram efetuadas em termocicladores My Cycler<sup>™</sup> e ICycler<sup>™</sup> IC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, EUA). As condições de amplificação encontram-se discriminadas na Tabela VI.

**Tabela VI.** Condições de amplificação (°C/min). D (Desnaturação); E (Emparelhamento); Ex (Extensão).

<i>Primers</i>	<b>Condições de Amplificação (°C/min.)</b>
<b>Pi<sub>1</sub></b> <b>Pi<sub>2</sub></b>	D inicial (94°/5min.); [D (94°/0,5min.), E (60°/0,5min.), Ex (72°/0,5min.)] x 30 ciclos E final (72°/10min.)
<b>Pg<sub>1</sub></b> <b>Pg<sub>2</sub></b>	D inicial (94°/5min.); [D (94°/0,5min.), E (55°/0,5min.), Ex (72°/0,5min.)] x 30 ciclos E final (72°/10min.)

### 3.2.3. ELETROFORESE

A análise dos fragmentos de ADN amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TAE 1x (40mM Tris-acetato e 1mM EDTA), contendo 0,1 µL/mL SYBR Safe<sup>TM</sup> DNA Gel Stain (Invitrogen, Paisly, Reino Unido). Para além das amostras, também foram aplicados no gel de agarose para a electroforese o marcador de peso molecular 100 bp BLUE extended DNA Ladder (Bioron International, Alemanha), e os controlos negativo e positivo. A eletroforese decorreu a 100 Volts, durante 35 minutos, em TAE 1x. Após eletroforese, o gel foi fotografado (Figura 14), em transiluminador sob luz UV (BioRad Laboratories, Hercules, EUA), acoplado a um sistema de obtenção de imagem Molecular Imager ChemiDoc<sup>XRS</sup> (Milão, Itália), que associado a um programa Quantity One version 4.6.1 Build 055 (BioRad Laboratories, Hercules, EUA) permite arquivar os resultados adquiridos.



**Figura 14.** Fotografia em gel de agarose da amplificação de algumas amostras, com aplicação na electroforese o Marcador de peso molecular 100 bp BLUE extended DNA Ladder (Bioron International, Alemanha), e os Controlos (-) negativo e (+) positivo para *Porphyromonas gingivalis* (Pg). Com o resultado de bandas com o tamanho esperado para a Pg das amostras 7 e 8 e ausência de bandas para as amostras 3 e 21.

#### 4. AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

##### 4.1. MÉTODO DE KIRBY-BAUER

Todo o procedimento técnico foi realizado de acordo com as instruções aconselhadas pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2012).

A avaliação da suscetibilidade aos antibióticos das amostras isoladas e identificadas, a partir das culturas e das provas bioquímicas, foi realizada pelo método clássico de difusão de disco (método de Kirby-Bauer) (EUCAST, 2012).

Neste procedimento, foi utilizado o meio de Columbia agar base, suplementado com 5% de sangue de cavalo desfibrinado, 5 µg/mL hemina e com 1 µg/mL menadiona, à temperatura ambiente.

Com auxílio de uma zaragatoa estéril retiraram-se algumas colónias bacterianas perfeitamente isoladas no meio de cultura de isolamento e foram suspensas em 2 mL de soro fisiológico (NaCl 0,9%) estéril, a fim de se obter uma turvação, medida em densitómetro, correspondente a 1,0 da escala de McFarland. Após a homogeneização da suspensão bacteriana e com nova zaragatoa estéril foi feita a inoculação em forma de estrias na superfície do agar em várias direções, de modo a garantir uma distribuição uniforme por toda a placa. Antes da aplicação dos discos, as placas semeadas eram

reservadas à temperatura ambiente, durante 5-10 minutos, para que o excesso de humidade da superfície do agar fosse absorvido.

Para o controlo de qualidade dos antibiogramas realizados, utilizaram-se as estirpes de referência, seguintes: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 e *Prevotella intermedia* ATCC 25611.

Foram usados discos de antibióticos (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, Inglaterra) com diâmetro de 6 mm. Os discos de antibióticos ensaiados foram os seguintes: penicilina (10U); amoxicilina (10 µg); amoxicilina + ácido clavulânico (2:1) (30 µg); metronidazol (5 µg); tetraciclina (30 µg) e clindamicina (2 µg).

A aplicação dos discos de antibióticos foi efetuada com auxílio de uma pinça estéril e cada disco foi colocado no centro de cada placa de Petri com uma ligeira pressão para garantir o seu contacto total com a superfície do agar, como se pode visualizar na Figura 15.



**Figura 15.** Meio de Columbia agar base (com 5% de sangue de cavalo desfibrinado, 5 µg/mL hemina e com 1 µg/mL menadiona), semeado e com disco de antibiótico aplicado no centro da placa de Petri.

Os antibiogramas foram efetuados em duplicado para cada antibiótico. As placas semeadas foram invertidas e colocadas em jarras de anaerobiose e incubadas por 7-14 dias, a 37° C, em atmosfera de anaerobiose conseguida pelo sistema automático, referido anteriormente.

#### 4.1.1. LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

Após o período de incubação, os halos de inibição resultantes apresentavam-se uniformemente circulares num “tapete” de crescimento bacteriano (Figura 16).



**Figura 16.** Exemplo de um halo de inibição de crescimento bacteriano em redor do disco de antibiótico.

O tamanho da zona de inibição do crescimento em torno do disco indica a suscetibilidade relativa ao agente antimicrobiano. Daí que, o método de difusão de disco seja qualitativo, ou seja, apenas permite classificar a amostra bacteriana em Sensível (S), Intermédia (I) ou Resistente (R) ao agente antimicrobiano ensaiado.

Os halos de inibição de crescimento bacteriano foram medidos em milímetros com auxílio de uma craveira.

Foi calculado o valor médio das medições obtidas para cada antibiótico ensaiado em duplicado para a mesma estirpe bacteriana.

Os diâmetros dos halos de inibição foram interpretados, de acordo com os critérios de interpretação preconizados pelo EUCAST (2010) (Anexo I).

#### 4.2. PESQUISA DE ENZIMAS $\beta$ -LACTAMASES

A pesquisa de enzimas  $\beta$ -lactamases foi realizada com uma cefalosporina cromogénica nitrocefina, em discos, de acordo com as instruções do fabricante BD BBL DrySlide Nitrocefina (Becton Dickinson and Company, Maryland, EUA).

A positividade desta pesquisa foi evidenciada pela alteração da cor amarelo-pálido para a cor vermelha, entre 5 a 10 minutos, à temperatura ambiente. Os discos que não revelaram mudança de cor ao fim de 10 minutos foram incubados a 37°C, durante 1 hora (tempo limite para a revelação de  $\beta$ -lactamases). Ao fim deste tempo, se não tivesse ocorrido alteração de cor, o resultado seria considerado negativo (Figura 17).



**Figura 17.** Exemplo de disco de nitrocefina utilizado para pesquisa de enzimas  $\beta$ -lactamases.



### **III. RESULTADOS**

#### **1. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS**

Neste trabalho foram analisadas 42 amostras clínicas de pacientes adultos portadores de periodontites.

As primeiras 28 amostras colhidas foram semeadas, conforme indicado nos Materiais e Métodos, até à obtenção de culturas puras, com colónias negras, isoladas e inteiramente delimitadas. Aos isolados puros, foram efetuados testes primários de identificação presuntiva, que abrangeram, a coloração de Gram e o teste da catalase. Seguidamente, colónias puras foram transferidas para TSB / 20% glicerol e congeladas a -80°C, para posteriores identificações: bioquímica e molecular.

As 14 amostras clínicas seguintes, (mais recentes) foram submetidas a igual procedimento laboratorial, que as anteriores, mas foram conservadas em TSB / 20% glicerol, a -20°C.

Aquando da caracterização bioquímica, dos 42 isolados, apenas 14 mostraram crescimento em meio de Columbia agar base com evidência de colónias com pigmento negro.

Todas as amostras foram sujeitas a extração do ADN e submetidas a identificação por PCR por forma a identificar molecularmente *P. gingivalis* e *P. intermedia*.

#### **2. IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS COM PIGMENTAÇÃO NEGRA**

##### **2.1. METODOLOGIA CLÁSSICA**

Como referido anteriormente, as 14 amostras cultiváveis e com revelação de colónias com pigmento negro, foram submetidos à identificação bioquímica por *Kit* comercial Rapid ID 32A.

De acordo, com o comportamento enzimático obtido pela leitura das galerias de API inoculadas, foram identificadas as espécies de bactérias pigmentadas como *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella spp.*

A caracterização bioquímica efetuada por sistemas automáticos proporcionou a identificação apresentada na Tabela VII.

**Tabela VII.** Identificação das amostras cultiváveis por *Kit* comercial Rapid ID 32A.

AMOSTRA N°	IDENTIFICAÇÃO (API 32A)
24	<i>P. intermedia</i> (99,9%)
27	<i>P. intermedia</i> (99,9%)
29	<i>P. intermedia</i> (99,9%)
30	<i>P. intermedia</i> (99,9%)
31	<i>P. gingivalis</i> (96,6%)
32	<i>P. gingivalis</i> (97,3%)
33	<i>P. intermedia</i> (99,9%)
34	<i>P. intermedia</i> (98,5%)
37	<i>Prevotella spp.</i>
38	Perfil inaceitável
39	<i>P. intermedia</i> (99,9%)
40	<i>P. intermedia</i> (73,6%)
41	<i>P. gingivalis</i> (96,6%)
42	<i>P. gingivalis</i> (99,9%)

Da consulta da tabela VII, verifica-se que foram identificadas 8 isolados de *P. intermedia* (57,1%), 4 isolados de *P. gingivalis* (28,6%) e 2 isolados de outras espécies pigmentadas (14,2%).

## 2.2. METODOLOGIA MOLECULAR

A caracterização molecular dos 42 isolados foi efetuada por PCR, cujos resultados estão apresentados na Tabela VIII.

**Tabela VIII.** Identificação dos isolados das amostras clínicas por PCR.

AMOSTRA N°	IDENTIFICAÇÃO (PCR)
1	<i>P. intermedia</i>
2	<i>P. intermedia</i>
3	<i>P. gingivalis</i>
4	<i>P. intermedia</i>
5	<i>P. intermedia</i>
6	<i>P. intermedia</i>
7	<i>P. gingivalis</i>
8	<i>P. gingivalis</i>
9	<i>P. gingivalis</i>
10	<i>P. intermedia</i>
11	<i>P. intermedia</i>
12	Sem amplificação
13	<i>P. gingivalis</i>
14	Sem amplificação
15	Sem amplificação
16	Sem amplificação
17	Sem amplificação
18	Sem amplificação
19	Sem amplificação
20	<i>P. intermedia</i>
21	<i>P. intermedia</i>
22	<i>P. intermedia</i>
23	<i>P. gingivalis</i>
24	<i>P. intermedia</i>
25	<i>P. intermedia</i>
26	Sem amplificação
27	<i>P. intermedia</i>
28	Sem amplificação
29	<i>P. intermedia</i>
30	<i>P. intermedia</i>
31	<i>P. gingivalis</i>
32	<i>P. gingivalis</i>
33	Sem amplificação
34	<i>P. intermedia</i>
35	<i>P. gingivalis</i>
36	Sem amplificação
37	Sem amplificação
38	Sem amplificação
39	<i>P. intermedia</i>
40	<i>P. intermedia</i>
41	<i>P. gingivalis</i>
42	<i>P. gingivalis</i>

Os resultados obtidos indicam que, do total dos isolados, 18 foram identificados como *P. intermedia* (43%) e 11 como *P. gingivalis* (26%). Em 13 estirpes bacterianas (31%) não foi observada a amplificação do ADN com os *primers* específicos para *P. gingivalis* ou *P. intermedia*.

### 2.3. COMPARAÇÃO ENTRE A METODOLOGIA CLÁSSICA E MOLECULAR

Considerando as amostras isoladas produtoras de pigmento negro, viáveis pelo método convencional de cultura, verificou-se uma boa correlação entre os dois métodos de identificação (clássico e molecular). Os 12 isolados identificados pelo método clássico como *P. gingivalis* e *P. intermedia*, todos foram confirmados por PCR (Tabela IX).

**Tabela IX.** Isolados bacterianos produtores de pigmento negro identificados por *Kit* comercial Rapid ID 32A e confirmados pelo método molecular (PCR).

AMOSTRA N°	IDENTIFICAÇÃO (ID 32A)	IDENTIFICAÇÃO (PCR)
24	<i>P. intermedia</i> (99,9%)	<i>P. intermedia</i>
27	<i>P. intermedia</i> (99,9%)	<i>P. intermedia</i>
29	<i>P. intermedia</i> (99,9%)	<i>P. intermedia</i>
30	<i>P. intermedia</i> (99,9%)	<i>P. intermedia</i>
31	<i>P. gingivalis</i> (96,6%)	<i>P. gingivalis</i>
32	<i>P. gingivalis</i> (97,3%)	<i>P. gingivalis</i>
33	<i>P. intermedia</i> (99,9%)	<i>P. intermedia</i>
34	<i>P. intermedia</i> (98,5%)	<i>P. intermedia</i>
39	<i>P. intermedia</i> (99,9%)	<i>P. intermedia</i>
40	<i>P. intermedia</i> (73,6%)	<i>P. intermedia</i>
41	<i>P. gingivalis</i> (96,6%)	<i>P. gingivalis</i>
42	<i>P. gingivalis</i> (99,9%)	<i>P. gingivalis</i>

### 3. SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

#### 3.1. LEITURA DOS HALOS DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

Dos 14 isolados que inicialmente demonstraram crescimento em placa e foram identificados por galerias ID32A (Tabela VII), apenas 12 foram sujeitos à prova de suscetibilidade aos antibióticos. Este facto deveu-se ao insucesso do crescimento dos isolados 27 e 34, aquando da realização dos referidos testes de suscetibilidade.

Na tabela X apresenta-se a conversão dos diâmetros dos halos de inibição medidos, nos termos correspondentes a Sensível (S) e Resistente (R), de acordo com as normas recomendadas pelo EUCAST (2010).

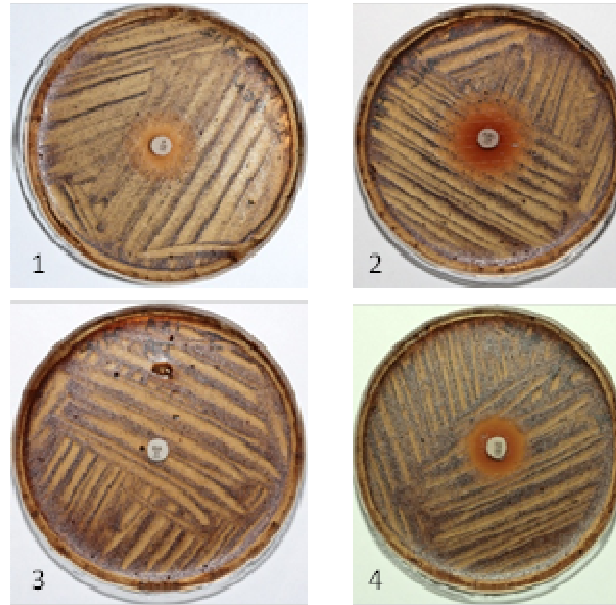
**Tabela X.** Interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade aos antibióticos obtidos por medição dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento bacteriano (EUCAST, 2010).

AMOSTRAS	ESPÉCIES	PEN	AML	AMC	MTZ	DA	TE
24	<i>P. intermedia</i>	S	S	S	S	S	S
29	<i>P. intermedia</i>	S	S	S	S	S	S
30	<i>P. intermedia</i>	S	S	S	S	S	S
31	<i>P. gingivalis</i>	S	S	S	S	S	S
32	<i>P. gingivalis</i>	S	S	S	S	S	S
33	<i>P. intermedia</i>	S	S	S	S	S	S
37	<i>Prevotella spp</i>	R	R	S	S	R	R
38	Outra pigmentada	R	R	S	S	R	S
39	<i>P. intermedia</i>	S	S	S	S	S	S
40	<i>P. intermedia</i>	S	S	S	S	S	S
41	<i>P. gingivalis</i>	S	S	S	S	S	S
42	<i>P. gingivalis</i>	S	S	S	S	S	S

Identificação das abreviaturas indicadas na tabela: **PEN** (penicilina); **AML** (amoxicilina), **AMC** (amoxicilina + ácido clavulânico); **MTZ** (metronidazol); **DA** (clindamicina); **TE** (tetraciclina), **S** (sensível), **R** (resistente).

Verificou-se que, do total de isolados de *Prevotella spp*, 85,7% eram *P. intermedia* e mostraram-se sensíveis a todos os antibióticos ensaiados e 14,3% correspondiam a

*Prevotella spp.* (amostra 37), que exibiu resistência aos seguintes agentes antimicrobianos: penicilina, amoxicilina, clindamicina e tetraciclina (Figura 17).



**Figura 18.** Suscetibilidade da estirpe da amostra 37, aos antibióticos Penicilina 10 U (1), Amoxicilina 10 µg (2), Clindamicina 2 µg (3) e Tetraciclina 30 µg (4).

Uma outra estirpe que cresceu com pigmento, não identificada pelo método ID32A (amostra 38), exibiu resistência à penicilina, amoxicilina e clindamicina (Figura 18).



**Figura 19.** Suscetibilidade da estirpe da amostra 38, aos antibióticos Penicilina 10 U (1), Amoxicilina 10 µg (2) e Clindamicina 2 µg (3).

Nenhum dos isolados da espécie *P. gingivalis* mostrou resistência aos agentes antimicrobianos testados.

### 3.2. LEITURA DA PESQUISA DE ENZIMAS $\beta$ -LACTAMASES

A pesquisa de estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases foi realizada com discos de papel impregnados com uma cefalosporina cromogénica (nitrocefina).

Dos isolados microbianos testados, apenas dois (amostras 37 e 38) revelaram serem estirpes com capacidade de produção de enzimas  $\beta$ -lactamases (Tabela XI).

**Tabela XI.** Resultados dos testes de nitrocefina dos isolados que foram submetidos aos testes de suscetibilidade antimicrobiana.

AMOSTRAS Nº	ESPÉCIES	TESTES de NITROCEFINA
24	<i>P. intermedia</i>	negativo
29	<i>P. intermedia</i>	negativo
30	<i>P. intermedia</i>	negativo
31	<i>P. gingivalis</i>	negativo
32	<i>P. gingivalis</i>	negativo
33	<i>P. intermedia</i>	negativo
37	<i>Prevotella spp</i>	<b>positivo</b>
38	<i>Outra pigmentada</i>	<b>positivo</b>
39	<i>P. intermedia</i>	negativo
40	<i>P. intermedia</i>	negativo
41	<i>P. gingivalis</i>	negativo
42	<i>P. gingivalis</i>	negativo



#### IV. DISCUSSÃO

O trabalho realizado teve como objetivos pesquisar e identificar a presença de bactérias pigmentadas, nomeadamente *Porphyromonas* sp. e *Prevotella* sp., associadas à DP, e avaliar a sua suscetibilidade aos antibióticos usualmente prescritos pelo clínico em Portugal. Foi ainda, avaliada a produção das enzimas  $\beta$ -lactamases, frequentemente associadas a estas espécies bacterianas.

Na década de noventa, Walker (1996) refere que a sensibilidade aos agentes antimicrobianos das bactérias localizadas na cavidade oral é cada vez menor e que, gradualmente se verifica uma tendência de resistência, com especial relevo nos géneros *Prevotella* e *Porphyromonas* aos antibióticos habitualmente prescritos em odontologia e estomatologia (Walter, 1996; Aldridge *et al.*, 2001). Por outro lado, estes géneros têm sido associados a sinais e sintomas de origem endodôntica, como dor espontânea, dor à palpação, edema e exsudato, o que os torna particularmente relevantes para o tipo de terapêutica usada (Baumgartner *et al.*, 1999; Jacinto *et al.*, 2003).

Foram analisadas 42 amostras clínicas de pacientes portadores de periodontite, amostras estas correspondentes a isolados de bolsas gengivais de pacientes que não tinham efetuado qualquer tipo de tratamento antimicrobiano. Dos 42 isolados obtidos, apenas 14 apresentaram crescimento em meio de Columbia agar base com colónias pigmentadas de negro (Tabela VII). O baixo sucesso na obtenção de culturas viáveis a partir das amostras poderá ter sido consequência da seletividade intrínseca dos métodos clássicos de cultura já referido anteriormente (Segata *et al.*, 2012).

A identificação bioquímica com as galerias ID32A permitiu verificar que 57,1% das bactérias que apresentaram pigmento negro eram *Prevotella intermedia*, 28,6% eram *Porphyromonas gingivalis*, 7,14% *Prevotella spp* e 7,14% outra espécie pigmentada.

A identificação molecular de *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* nas 42 amostras foi efetuada por PCR. Verificou-se que 43% das amostras correspondiam a *Prevotella intermedia* e 26% das amostras correspondiam a *Porphyromonas gingivalis*. Cerca de 31% das estirpes bacterianas não foram identificadas como sendo *P. gingivalis*

ou *P. intermedia*, pois não se observou amplificação do ADN com os *primers* específicos para estas duas estirpes bacterianas.

Comparando as metodologias clássica e molecular verificou-se que, neste trabalho, todos os isolados de *Prevotella intermedia* e de *Porphyromonas gingivalis* identificados bioquimicamente, foram confirmados por PCR.

A presença de *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* nas amostras colhidas está de acordo com as publicações dedicadas à etiologia da doença periodontal, assim como proporção percentual entre as duas estirpes está concordante com a bibliografia (Mikamo, Arakawa, Fujiwara *et al.*, 2011).

Desde há várias décadas, estas espécies estão associadas à patogénese das infeções periodontais (Slots, 1977; Loesche e Grossman, 2001; Kumar *et al.*, 2003, 2005; Kuramitsu *et al.*, 2007). Como referido anteriormente, *Porphyromonas gingivalis* é característica da região subgingival, sendo produtora de inúmeros fatores de virulência que contribuem para evolução da DP, tais como fimbrias, lipopolissacarídeos, cápsula e produção de metabolitos e enzimas (Goulbourne e Ellen, 1991).

A *Prevotella intermedia*, como referenciado anteriormente, também pode ser encontrada nas bolsas periodontais, possuindo um elevado número de fatores de virulência, tais como, fimbrias e adesinas, cápsula polissacarídea, atividade fibrinolítica e capacidade de degradação das imunoglobulinas através da produção de proteases (Paster, 2001).

Relativamente à suscetibilidade antimicrobiana, foram testadas as 12 amostras (Tabela X). Ao contrário do esperado, todos os isolados da espécie *Porphyromonas gingivalis* foram sensíveis a todos os antibióticos ensaiados, o que não está de acordo com alguma da literatura publicada, no que refere à sensibilidade aos antimicrobianos dos periodontogénicos (Maestre *et al.*, 2007; Blandino *et al.*, 2007). Esta sensibilidade verificou-se tanto para os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilina e amoxicilina, os mais usados no tratamento de infeções odontogénicas, como para os outros testados (amoxicilina + ácido clavulâmico, metronidazol, clindamicina e tetraciclina).

Relativamente às bactérias do género *Prevotella*, também todos os isolados e identificados de *Prevotella intermedia*, se mostraram sensíveis a cada um dos antibióticos testados. Estes resultados estão em desacordo com alguma da literatura publicada (Dubreuil *et al.*, 2003; Blandino *et al.*, 2007). Comparativamente ao estudo de Maestre e colaboradores, que analisaram 261 isolados, a nossa pequena amostragem pode ter contribuído para a falta de concordância dos resultados (Maestre *et al.*, 2007).

No entanto, a espécie *Prevotella spp* (amostra 37) exibiu resistência aos seguintes agentes: penicilina, amoxicilina, clindamicina e tetraciclina. Estes resultados vêm ao encontro de estudos anteriores (Aldridge *et al.*, 2001), onde se observa uma clara tendência para a resistência farmacológica em algumas espécies de *Prevotella* sendo necessário em muitos casos recorrer a uma combinação de antibióticos com um espectro de ação mais alargado.

No que respeita à amostra 38, correspondente à estirpe pigmentada observou-se resistência aos seguintes agentes antimicrobianos: penicilina, amoxicilina e clindamicina.

Relativamente à produção de enzimas  $\beta$ -lactamases foram testadas as amostras utilizadas nos testes de suscetibilidade antimicrobiana.

Dos isolados microbianos testados apenas dois se revelaram positivos, quanto à capacidade de produção das enzimas  $\beta$ -lactamases – amostras 37 e 38. Como referido anteriormente, estas enzimas provocam a inativação dos compostos  $\beta$ -lactâmicos, sendo condição determinante para o aumento da resistência bacteriana (Kononem *et al.*, 1998).

Várias espécies do género de *Prevotella* produtora de  $\beta$ -lactamases têm sido observadas na microflora subgingival (Kuriyama *et al.*, 2001) o que está de acordo com os resultados obtidos e concordante com o resultado do Teste de Kirby-Bauer, que revelou resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como a penicilina e amoxicilina.

De referir que neste trabalho, foram utilizados dois métodos distintos para a identificação de bactérias intervenientes na doença periodontal: métodos clássicos e métodos moleculares. Os métodos clássicos revelaram-se eficazes na identificação bacteriana, no entanto, com a congelação, várias amostras perderam a viabilidade e não foi possível obter a sua cultura. Por outro lado, os métodos moleculares amplificaram todas as amostras identificadas pelos métodos clássicos, revelando elevada eficiência, demonstrada pela rapidez e precisão dos resultados.

Como uma das sugestões de trabalho futuro, seria fundamental extrair o ADN diretamente das amostras, sem recorrer a métodos culturais, e aumentar a diversidade de *primers* utilizados na amplificação. Deste modo, seria possível identificar um maior número de espécies envolvidas na DP. Igualmente, a resistência aos antimicrobianos

poderia ser realizada com recurso a técnicas moleculares, permitindo a revelação de genes de resistência presentes na flora bacteriana característica da DP.

Este estudo decorreu com diversas limitações, não só o reduzido número de amostras, como também da aplicação de técnicas novas no nosso Laboratório. Estes eventos poderão ter contribuído para que os resultados relativamente à suscetibilidade aos antimicrobianos, não sejam concordantes com alguns dos artigos referenciados neste trabalho. Contudo, este estudo foi uma primeira abordagem deste tema tão importante, contribuindo para o incentivo de mais estudos em Portugal, sobre as resistências bacterianas de bactérias patogéneas em Medicina Dentária.



## V. CONCLUSÕES

A periodontite é uma doença inflamatória crónica da cavidade oral, cujo principal fator etiológico são os microrganismos que residem no interior da placa bacteriana, querem quantidade, em qualidade e em suscetibilidade genética do hospedeiro, conduzindo a um quadro inflamatório e de destruição da parte gengival, do osso alveolar e outras estruturas de suporte dentário.

A manutenção destas condições no ambiente subgengival permite a formação de abrigos próprios, onde bactérias não comensais amotinam as defesas imunológicas do hospedeiro e induzem virulência em todo o biofilme, em função do seu desenvolvimento.

A identificação da microbiota responsável pelas periodontites e as resistências aos antibióticos são determinantes na adoção de medidas terapêuticas eficazes no controlo da patologia.

As estirpes bacterianas produtoras de pigmento negro, em particular, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas gingivalis* são frequentemente identificadas nas doenças periodontais, como foi demonstrado. Tal como esperado, a técnica por PCR mostrou uma maior sensibilidade na identificação das espécies, comparando com as limitações de cultivo pela metodologia clássica.

É necessário a realização de muitos mais estudos, com uma maior amostragem, sobre a identidade das estirpes bacterianas em infeções periodontais na população portuguesa e as suas resistências aos comuns antimicrobianos prescritos.

Relativamente à suscetibilidade antimicrobiana, principalmente aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, sendo estes os agentes antimicrobianos mais frequentemente prescritos em Portugal, na área da Medicina Dentária, conclui-se que as estirpes isoladas de *Porphyromonas gingivalis* assim como de *Prevotella intermedia*, não demonstraram resistência, ao contrário do que seria esperado pela revisão da literatura.

Contudo, o isolamento cada vez mais frequente de outras estirpes bacterianas, pedem novos estudos acerca do seu comportamento face a outros antibióticos potencialmente

usados no tratamento de infeções periodontais. O conhecimento de resistências bacterianas irá auxiliar na seleção do melhor antibiótico para a erradicação da infeção, no qual se destaca a produção de  $\beta$ -lactamases pelos principais agentes bacterianos causadores de infeções na cavidade oral.

Neste contexto, a terapia profiláctica de infeções orais deve ser tido em conta, não só o tipo de microrganismo, como também o eventual perfil de resistência antimicrobiana.

Como futuros estudos, propõe-se a amplificação direta do ADN bacteriano colhido nas bolsas periodontais, por forma a não existir seleção cultural das bactérias. Este tipo de técnicas poderá também ser uma mais-valia na análise da suscetibilidade que os agentes etiológicos da DP apresentam aos antimicrobianos disponíveis no mercado, principalmente em Portugal.

## VI. BIBLIOGRAFIA

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

Aldridge K., Ascraft D., Cambre K., Pierson C., Rosenblatt J. (2001). Multicenter survey of the changing in vitro antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Bacteroides fragilis* group, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* and *Peptostreptococcus* species. *Antimicrob Agents Chemother.* 45 (4): 1238-1243.

Al-Haroni, M.H., Skaug N., Al-Hebshi N.N. (2006). Prevalence of subgingival bacteria resistant to aminopenicillins and metronidazole in dental patients from Yemen and Norway, *Int J. Antimicrob Agents*, 27: 217-223.

Almeida, AE, de Filippis I, Ferreira DG, de Abreu AO, Rebelo C, Gemal AL, Marzochi KB. (2006). Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990-2003). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 54 (1): 57-62.

Amano A., Fujiwara T., Nagata H., et al. (1997). *Porphyromonas gingivalis* fimbriae mediate coaggregation with *Streptococcus oralis* through specific domains. *J. Dent. Res.* 76: 852-857.

American Academy of Periodontology. Types of Gum Disease. Disponível em: <http://www.perio.org/consumer/2a.html>, [Em linha] Consultado em 01-03-2013.

Anderson M.R. (2002). Assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature, *Pediatr Dent*; 24 (5): 377-385.

Ardila C.M., Granada M.I., Guzmán I.C., (2010). Antibiotic resistance of subgingival species in chronic periodontitis patients. *J Periodontal Res.* 45: 557-563.

Atieh MA. (2008). Accuracy of real-time polymerase chain reaction versus anaerobic culture in detection of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*: a meta-analysis. *J Periodontol*; 79:1620-1629.

Avila M., Ojcius D.M., Yilmaz O. (2009) The oral microbiota: living with a permanent guest. *DNA Cell Biol.* 28: 7.

Axelsson P. (2000). Diagnosis and risk prediction of dental caries. v. 2. Illinois: Quintessence books.

Bascones A, Morante S. (2006). Antisépticos orales. Revisión de la literatura y perspectiva actual. *Av Periodon Implantol.* 18 (1): 31-59.

Bascones A., Aguirre J., Bermejo A., Blanco A., Gay-Escoda C., Gozález-Moles M., *et al.* (2004). Documento de consenso sobre o tratamento antimicrobiano de las infecciones bacterianas odontogenicas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 9: 363-376.

Bascones M.A, Figuero R.E. (2005) Periodontal diseases as bacterial infection. *Av Periodon Implantol.* 17: 111-118.

Baumgartner J., Watkins B., Bae k., Xia T. (1999) Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *J. Endod.* 25: 413-415.

Becker, W.; Becker, B.E.; Neuman, M.G.; Nyman, S. (1990). Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int. J. Oral Maxillofacial Implants.*, 5: 31-38.

Bernimoulin J.P. (2003). Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol.* 30 (5): 7-9.

Bik E.M., Long C.D., Armitage G.C., Loomer P., Emerson J., Mongodin E.F., Nelson K.E., Gill S.R., Fraser Liggett C.M., Relman D.A. (2010) Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *ISME J.* 4: 962-974.

Blandino G., Milazzo I., Fazio D., Puglisi S., Pisano M., Speciale A., Pappalardo S. (2007). Antimicrobial susceptibility and beta-lactamase production of anaerobic and aerobic bacteria isolated from pus specimens from orofacial infections. *J Chemother.* 19: 495-499.

Bourgeau G., Lapointe H , Peloquin P , Mayrand D. (1992). Cloning expression, and sequencing of a protease gene (*tpr*) from *Porphyromonas gingivalis* W83 in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60: 3186-3192.

Brazier J., Chmelar D., Dubreuil L., Feierl G., Hedberg M., Kalenic S., Könönen E., Lundgren B., Malamou-Ladas H., Nagy E., Sullivan A., Nord C.E. (2008). ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. European surveillance study on antimicrobial susceptibility of Gram-positive anaerobic cocci. *Int J Antimicrob Agents.* 31: 316-320.

Brazier J.S., Hall V., Morris T.E., Gal M., Duerden B.I. (2003) Antibiotic susceptibilities of Gram-positive anaerobic cocci: results of a sentinel study in England and Wales. *J Antimicrob Chemother.* 52: 224-228.

Brook I. (2016). Spectrum and treatment of anaerobic infections. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 22 (1): 1-13.

Brook, I. (2007). Treatment of anaerobic infection. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 5: 991-1006.

Byrne SJ, Dashper SG, Darby IB, Adams GG, Hoffmann B, Reynolds EC. (2009). Progression of chronic periodontitis can be predicted by the levels of *P. gingivalis* and *T. denticola* in subgingival plaque. *Oral Microbiol Immunol.*, 24: 1-9.

Carrilho, M. R., Carvalho, R. M., Sousa, E. N., Nicolau, J., Breschi, L., Mazzoni, A., Pashley, D. H. (2010). Substantivity of Chlorhexidine to Human Dentin. *Dental Materials*, 26 (8): 779-785.

Cecchin D, de Almeida JF, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC. (2011). Effect of chlorhexidine and ethanol on the durability of the adhesion of the fiber post relined with resin composite to the root canal. *J Endod.*, 37 (5): 678-683.

Chan Y., Chan C. (2003). Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 36: 105-110.

Chu L, Bramanti TE, Holt SC, Ebersole JL. (1991). Hemolytic activity in the periodontopathogen, *Porphyromonas gingivalis*: kinetics of enzyme formation and localization. *Infect. Immun.* 59: 1932-1940.

Chung, W.O; Hansen, S.R; Rao, D; Dale, B.A. (2004). Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. *J. Immunol.* 173: 5165-5170.

Cutler C.W., Kalmar JR., Genco CA. (1995). Pathogenic strategies of the oral anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*. *Trends Microbiol.*, 3: 45-51.

Dahlén G., Lindhe J., Sato K., Hanamra H., Okamoto H. (1992) The effect of supragingival plaque control on the subgingival microbiota in subjects with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 19: 802-809.

Darby I., Curtis M. (2001) Microbiology of periodontal disease in children and young adults. *Periodontol 2000.* 26: 33-53.

Dashi A, Kadouri D. (2011). Predation of Oral Pathogens by *Bdellovibrio bacteriovorus* 109J. *Mol Oral Microbiol* 26: 16.

de Almeida P., Gregio A., Machado M., de Lima A., Azevedo L. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J. Contemp. Dent. Pract.*, 9 (3): 72-80.

Deas D., Mackey S., McDonnell H. (2003). Systemic disease and periodontitis: manifestations of neutrophil dysfunction. *Periodontology 2000.* 32: 82-104.

---

Dewhirst F., Chen T., Izard J., Paster B., Tanner A., Yu W., Lakshmanan A., Wade W. (2010) The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* 192: 5002-5017.

Domenica G., Sweier P., Sandra S., William V., *et al.* (2009). Immunoglobulin G (IgG) Class, but Not IgA or IgM, Antibodies to Peptides of the *Porphyromonas gingivalis* Chaperone HtpG Predict Health in Subjects with Periodontitis by a Fluorescence Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical and Vaccine Immunology.* 16: 1766–1773.

Dubreuil L, Behra-Miellet J, Vouillot C, Bland S, Sedallian A, Mory F (2003)  $\beta$ -lactamase production in *Prevotella* and in vitro susceptibilities to selected  $\beta$ -lactam antibiotics. *Int. J. of Antimicrobial Agents.* 21: 267 – 273.

Edgar WM. (1992). Saliva: its secretion, composition and functions. *Br Dent J.* 172: 305-312.

Eley B. (1999). Antibacterial agents in the control of supragingival plaque- a review. *British Dental Journal.* 186: 286-289.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [Em linha] Disponível em <<http://www.eucast.org>>[Consulta em 1.03.2013]

Filoché S, Wong L, Sissons CH (2010). Oral biofilms: emerging concepts in microbial ecology. *J Dent Res* 89: 8–18.

Flemmig T.F., Beikler T. (2011). Control of oral biofilms. *Periodontol* 55: 9–15.

Frandsen, E., Poulsen, K., and Kilian, M. (1995). Confirmation of the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 429-435.

Gaetti-Jardim Jr E., Gaetti-Jardim E., Lins, S, Oliveira S, Semenoff, S. (2007). Suscetibilidade de bactérias anaeróbias isoladas de infecções periimplantares e periodontais ao metronidazol, lincosaminas, macrolídeos e tetraciclina. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS.* 22 (56): 131-137.

Gemmell, E., Yamazaki, K., Seymour, G. (2007). The role of T cells in periodontal disease: homeostasis and autoimmunity, *Periodontology* 2000.,43: 14-40.

Genco C., Maloy W., Kari U., Motley M. (2003). Antimicrobial activity of magainin analogues against anaerobic oral pathogens. *Int. J. Antimicrobial Agents.* 21: 75-78.

Genco, R.; Zambon J.; Murray P. (1985). Serum and gingival fluid antibodies as adjuncts in the diagnosis of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontal disease. *J Periodontol,* 56: 41-50.

George K. (2008). The effect of saliva on dental caries. *J. Am. Dent. Assoc.* 139: 11S-17S.

Gomes B, Jacinto R, Pinheiro E, Sousa E, Zaia A., Ferraz C. , Souza-Filho F. (2005). *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol.* 20 (4): 211-215.

Gordon J., Walker C., Hovliaras C., Socransky S. (1990). Efficacy of clindamycin hydrochloride in refractory periodontitis: 24-month results. *J. Periodontol.*, 61: 686-691.

Goulbourne P., Ellen R. (1991). Evidence that *Porphyromonas gingivalis* fimbriae function in adhesion to *Actinomyces viscosus*. *J. Bacteriol.* 173: 5266-5274.

Haffajee A., Torresyap G., Socransky S. (2007). Clinical changes following four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis: 1 year results. *J. Clin. Periodontol.* 34: 243-253.

Hamada N, Sojar H, Cho M-I, Genco R. (1996). Isolation and characterization of a minor fimbriae from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 64: 4788-4794.

Hecht D.W (2006) Anaerobes: Antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe* 12: 115–121.

Herrera D, Matesanz P, Bascones-Martínez A, Sanz M. (2012). Local and systemic antimicrobial therapy in periodontics. *J. Evid. Based Dent. Pract.*, 12 (3):50-60.

Herrera, D., van Winkelhoff, A., Dellelmijn-Hippuw, N., Winkel, E., Sanz, M. (2000). Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adults patients with periodontitis. A comparison between Spain and the Netherlands. *J. Clin. Periodontol.*, 27: 520-525.

Herrera-González, D.; Sanz-Aonso, M.; van Winkelhoff, A.; Winkel, E.; Dellelmijn-Hippuw, N. (2001). Resistencias bacterianas en la flora subgingival en España y Holanda. Estudio comparativo. *RCOE.*, 6 (3): 259-269.

Hidalgo M., Itano E., Nakagawa R., Trevisan Jr. W., Ávila-Campos M. (1998). Doença periodontal: estudo da resposta imune humoral. *Ver. Odontol. Univ. São Paulo*, 12 (3): 207-213.

Høiby N., Bjarnsholt T., Givskov M., Molin S., Ciofu O., (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35: 322-332.

Holt S., kaesavalu L., Walker S., Genco C. (1999). Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000, 20: 168-238.

Hornef W., Bogdan C. (2005). The role of epithelial Toll-like receptor expression in host defense and microbial tolerance. *Journal of endotoxin research* 11: 124–128.

<http://www.fortissima.com.br/2015/07/31/higiene-oral-e-melhor-forma-de-prevenir-doenca-periodontal-14703877>, [Em linha] Consultado em 05-06-2017.

<http://www.lasersinent.com/laser-indication.html>, [Em linha] Consultado em 21-07-2016.

<http://www.ligadodontista.com.br/gengivite-e-periodontite-doencas-que-amolecem-os-dentes/>, [Em linha] Consultado em 21-07-2016.

<http://www.periodontalhealthcenter.com/seriodontic-scaling-root-planning>, [Em linha] Consultado em 13-6-2017.

<http://www.zahn.de/red/behandlungsablauf-professionelle-zahnreinigung-597.asp>, [Em linha] Consultado em 21-07-2016.

Humphrey S., Williamson R. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent*. 85: 162-169.

Hung S-C, Choi CH, Said-Sadier N, Johnson L, Atanasova KR, *et al.* (2013). P2X4 Assembles with P2X7 and Pannexin-1 in Gingival Epithelial Cells and Modulates ATP-induced Reactive Oxygen Species Production and Inflammation some Activation. *PLoS ONE* 8(7): e70210.

Jacinto R., Gomes B. Ferraz C., Zaia A., Filho F. (2003) Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 18: 285-292.

Jansen H.J., van der Hoeven J.S. (1997). Protein degradation by *Prevotella intermedia* and *Actinomyces meyeri* supports the growth of non-protein cleaving oral bacteria in serum. *J Clin Periodontol.*, 24: 346–353.

Jenkinson HF, Lamont RJ. (2005). Oral microbial communities in sickness and in health, *Trends Microbiol.*; 13 (12): 589-95.

Kaldahl, WB., Kalkwarf, KL., Patil KD., Molvar, MP., Dyer, JK. (1996). Long-term evaluation of periodontal therapy: 1 response to 4 therapeutic modalities, *J. Periodont*, 67: 93-102.

Kinder S.A., Holt, S.C., Kornman K.S. (1986) Penicillin resistance in the subgingival microbiota associated with adult periodontitis. *J Clin Microbiol.* 23: 1127-1133.

Kolenbrander PE. (1993). Coaggregation of human oral bacteria potencial role in the accretion of dental plaque. *J. Appl. Bacteriol., Review.* 74: 79-86.

Komman, SK., Page, RC. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: a introduction, *Periodontology 2000*, 14: 9-12.

Könönen, E., Eerola E., Frandsen E., Jalava J., Matto J., Salmenlinna S., Jousimies-Somer H. (1998). Phylogenetic characterization and proposal of a new pigmented species to the genus *Prevotella*: *Prevotella pallens* nov. *Int. J Syst. Bacteriol.*, 48: 47-55.

Kumar P., Griffen A., Barton J., Paster B., Moeschberger M., Leys E. (2003). New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J Dent Res.* 82 (5): 338-344.

Kumar P., Griffen A., Moeschberger M., Leys E. (2005). Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S Clonal Analysis. *J Clin Microbiol.* 43: 3944-3955.

Kuramitsu H., He X., Lux R., Anderson M., Shi W. (2007). Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev.* 71 (4): 653-670.

Kuramitsu H., Yoneda M., Madden T. (1995). Proteases and collagenases of *Porphyromonas gingivalis*. *Adv Dent Res.* 9: 37-40.

Kuriyama, T; Karasawa, T; Nakagawa, K; Yamamoto, E. (2001). Incidence of  $\beta$ -lactamase production and antimicrobial susceptibility of anaerobic Gram-negative rods isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol. Immunol.* 16: 10-15.

Lakhssassi N., Elhajoui N., Lodter J., Pineil J., Sixou M. (2005). Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol.* 20: 244-252.

Lamont R., Jenkison H. (2000). Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* 15: 341-349.

Lamont R., Oda, D., Persson, R., Persson G. (1992). Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with gingival epithelial cells maintained in culture. *Oral Microbiol. Immunol.* 7: 364-367.

Lancaster H., Ready D., Mullany P., Sprat D., Bedi R., Wilson M. (2003). Prevalence and identification of tetracycline-resistant oral bacteria in children not receiving antibiotic therapy. *FEMS Microbiol.*, 228: 99-104.

Legg J., Wilson M. (1990). Prevalence of betalactamase producing bacteria in subgingival plaque and their sensitivity to Augmentin. *Br. J. Oral Maxillofac Surg.*, 28: 180-184.

Levy S. (2002). Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.49: 25–30.

Liñares, J. Martín-Herrero, J. (2003). Bases farmacomicrobiológicas del tratamiento antibiótico de las enfermedades periodontales y periimplatarias. *Av. Periodon. Implantol.* 15: 139-147.

Lindhe J., Hamp S., Loe H. (1975). Plaque induced periodontal disease in beagle dogs. A 4-year clinical, roentgenographical and histometrical study. *J. Periodontal Res.* 10: 243-255.

Lindhe J., Karring T., Lang N. (2003). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th edition, Blackwell Munksgaard Publishing Company

Listgarten M. (1976). Structure of surface coatings on teeth: A review. *J. Periodontol.*, 47: 139-147.

Listgarten M. (1994). The structure of dental plaque. *Periodontol.* 2000. 5: 52-65.

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

Love R.M. (2002). The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine. *Oral Microbiol Immunol.* 17: 32-37.

Lu H.; Wang M.; Gunsolley J.; Schenkein H.; Tew J. (1994). Serum immunoglobulin G subclass concentrations in periodontally healthy and disease individuals. *Infect. Immun.*, 62 (5): 1677-1682.

Maestre JR. (2002). Infecciones bacterianas mixtas de la cavidad oral. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 20: 98-101.

Maestre JR., Bascones A., Sánchez P., Matesanz P., Aguilar L., Giménez M.J., Pérez-Balcabao I., Granizo J.J., Prieto J. (2007). Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Rev Esp Quimioter* 20: 61-67.

Mariotti A. (1999). Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol.* 4: 7-19.

Marsh PD. (1994). Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. *Adv. Dent. Res.* 8: 263-271.

Marsh PD. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology.* 149 (2): 279-294.

Marsh PD., Bevis RA, Newman HN, Hallsworth AS, Robinson C, Weatherell JA, Pitter AF. (1989). Antibacterial activity of some plaque-disclosing agents and dyes. *Cárie Res.* 23 (5): 348-350.

Marsh PD., Bradshaw DJ. (1997). Physiological approaches to plaque control. *Adv Dent Res.* 11: 176–185.

Meng H. (1999). Periodontic-endodontic lessons. *Ann Periodontol.* 4: 7-19

Menoita E., Santos V., Testas C., Gomes C., Santos AS., (2012). Biofilms: Knowing the entity. *Journal of aging and innovation.* 1 (3): microbiology. *American Society for Microbiology*, 7th ed., Washington, DC.

Mims C., Dimmock N., Nash A., Stephen J. (1995). Mims' Pathogenesis of Infectious Disease. New York: Academic Press.

Mooney J., Kinane D. (1994). Humoral immune response to *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis and rapidly progressive periodontitis. *Oral Microbiol Immunol*, 9 (6): 321-326.

Mukherjee S. (1985). The role of crevicular fluid iron in periodontal disease. *J Periodontol.* 56: 22-27.

Mullis KB, Falaona FA. (1987). Specifics synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.

Murdock DA. (1998). Gram-Positive Anaerobic Cocci. *Clin. Microbiol. Reviews* 11: 81-120.

Murray P., Baron J., Pfaller A., Tenover C., Tenover H. (1999). Manual of clinical NCCLS. (1997). Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. National Committee for Clinical Laboratories Standards, Villanova, Approved standard, v.17, nº 2.

Nieuw AV, Veeman ECI (2002). Saliva – the defender of the oral cavity. *Oral Dis* 8: 12–22.

Ohta H, Kato K, Fukui K, Gottschal JC. (1991). Microbial interactions and the development of periodontal disease. *J Periodontal Res.*; 26 (3): 255-257.

Okuda K, Kato T, Naito Y, Ono M, Kikuchi Y, Takazoe I. (1986). Susceptibility of *Bacteroides gingivalis* to bactericidal activity of human serum. *J Dent Res.* 65: 1024-1027.

Olsen I., Amano A. (2015). Outer membrane vesicles - offensive weapons or good Samaritans? *J.Oral Microb.*, [S.l.], v. 7.

Paiva M., Nobile C., Angelillo I. (2003). Meta-analysis of local tetracycline in treatment chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 74: 916-932.

Papapanou P., Wennstrom J., Grondhal K. (1988). Periodontal status in relation to age and tooth type. A cross-sectional radiographic study. *J Clin Periodontol.*, 15: 469-478.

Papaparaskevas J., Pantazatou A, Katsandri A, Legakis NJ, Avlami A. Hellenic Study Group for Gram-Negative Anaerobic Bacteria. (2005). Multicentre survey of the in-vitro activity of seven antimicrobial agents, including ertapenem, against recently isolated Gram- negative anaerobic bacteria in Greece. *Clin Microbiol Infect.* 11 (10): 820-824.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA *et al.* (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology.* 12: 3770-3783.

Pihlström BL, Tabak L. (2005). The National Institute Dental and Craniofacial Research: research for the practicing dentist. *J Am Dent Assoc.*; 136 (6): 728-737.

Piovano, S. (1999). Bacteriology of most frequent oral anaerobic infections. *Anaerobe*, 5: 221-227.

Pitt T., Saunders N. (2000). Molecular bacteriology: a diagnostic tool for the millennium. *J. Clin. Pathol.* 53: 71-75.

Poole, K. (2004). Resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 61: 2200-2223.

Prabhavathi F. (2006). Antibacterial discovery and development - the failure of success. *Nat. Biotechnol.* 24: 1497-1503.

Pumbwe L., Wareham D., Aduse-Opoku J., Brazier J., Wexler H. (2007). Genetic analysis of mechanisms of multidrug resistance in a clinical isolate of *Bacteroides fragilis*. *Clin Microbiol Infect.* 13: 183-189.

Rickard A., Kolenbrander P., Handley P., Gilbert P. (2003). Bacterial coaggregation: An integral process in multi-species biofilm development. *Trends in Microbiology.* 11: 94-100.

Rosan B., Lamont, R.J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes and infection*. 2: 1599-1607.

Rush D., Abdel-Haq N., Zhu J., Amar B., Malian M. (2007). Clindamycin versus unasyn in the treatment of facial cellulites of odontogenic origin in children. *Clin Pediatr*. 46 (2): 154-159.

Sabatini, C., Pashley, D.H. (2014). Mechanisms Regulating the Degradation of Dentin Matrices by Endogenous Dentin Proteases and their Role in Dental Adhesion. A Review. *American Journal of Dentistry*, 27 (4): 203-214.

Saglio F., Smith C., Newman M., Carranza F., Pertuiset J., Cheng L., Auil E, Nisengard R. (1986). The presence of bacteria in the oral epithelium in periodontal disease. II. Immunohistochemical identification of bacteria. *J Periodontol*. 57: 492-500.

Salari H. e Kadhoda Z., (2004) Rate of cultivable subgingival periodontopathogenic bacteria in chronic periodontitis. *J Oral Sci*. 46: 157-161.

Sandros J., Papapanou P., Nannmark U., Dahle'n G. (1994). *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium *in vitro*. *J. Periodontal Res*. 29: 62-69.

Santos C., Sakai V., Machado M., Schippers D., Greene A. (2004). Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *J. Appl. Oral Sci*. 12 (1): 1-11.

Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. (2004). Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol.*,31: 1034-1047.

Schelburne S.A. III, Sumbly P., Sitkiewicz I., Granville C., DeLeo F.R., Mussner J.M., (2005) Central role of a bacterial two-component gene regulatory system of previously unknown function in pathogen persistence in human saliva. *Proc. Natl. Acad Sci USA* 102: 16037-16042.

Schenkels L., Veerman E, Amerongen A. (1995). Biochemical composition of human saliva in relation to other mucosal fluids. *Crit Rev Oral Biol Med*. 16: 161-175.

Segata N, Haake SK, Mannon P, Lemon KP, Waldron L, Gevers D, *et al.* (2012). Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biology*, 13: R42.

Shabbir A, Rashid M, Tipu HN (2016) Propolis, a hope for the future in treating resistant periodontal pathogens. *Cureus* 8: 682.

Shabbir A., Rashid M., Tipu H.N. (2016). Propolis, a hope for the future in treating resistant periodontal pathogens. *Cureus* 8: 682.

Shah H., Bonnett R., Mateen B., Williams R. (1979). The porphyrin pigmentation of subspecies of *Bacteroides melaninogenicus*. *Biochem J.* 180: 45-50.

Shah H., Collins M. (1988). Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 38 (1): 128-131.

Shah H., Williams R. (1987). Utilization of glucose and amino acids by *Bacteroides intermedius* and *Bacteroides gingivalis*. *Curr. Microbiol.* 15: 241-246.

Siqueira Jr. J., Rôças I. (2004). Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg. Oral Med Oral Pathol. Oral Radiol and Endodon.* 97: 85-94.

Siqueira, J., Rôças, I. (2007). Bacterial Pathogenesis and Mediators in Apical Periodontitis. *Brazilian Dental Journal*, 18 (4): 267-280.

Slots J. (1977). Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand J Dent Res.*, 247-254.

Socransky S., Haffajee A. (1991). [Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J. Periodontal Res.*; 26: 195-

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

Socransky S., Haffajee A., Cugini M., Smith C., Kent J. (1998). Microbial complex in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25: 134-144.

Socransky S.; Haffajee A. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. *J. Periodontol.* 63: 322-331.

Song Y. (2005). PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe.* 11: 79-91.

Sousa E., Gomes B., Jacinto R., Zaia A., Ferraz C. (2013). Microbiological profile and antimicrobial susceptibility pattern of infected root canals associated with periapical abscesses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 32: 573–580.

Sousa J.C. (2005) Manual de Antibióticos Antibacterianos. Edições Universidade Fernando Pessoa.

Spratt D., Pratten J. (2003). Biofilms and the oral cavity. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology.* 2: 109-120.

Sreebny L, Baum B, Edgar W, Epstein J, Fox P, Larmas M. (1992). Saliva: Its role in health and diseases. *Int Dent J.* 42: 291-304.

Standard Unit, Microbiology Services (2015) Identification of Anaerobic Cocci nº3: Public Health England, 1-29.

Summanem, P., Baron, E., Citron D. (1993). Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual. Belmont, CA, Star Publishing Co.

Sundqvist G. (1993). Pathogenicity and virulence of black-pigmented gram-negative anaerobes. *FEMS Immun Med Microbiol.* 6: 125-138.

Sundqvist G., Carlsson J., Herrmann B., Tánvik A. (1985) Degradation of human immunoglobulins G and M and complement factors C3 and C5 by black pigmented *Bacteroides*. *J Med Microbiol.* 19: 85–94.

Sundqvist G., Figdor D., Hanstrom L., Sorlin S., Sandstrom G. (1991). Phagocytosis and virulence of different strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Scand J Dent Res.* 99: 117-129.

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

Travis J., Pike R., Imamura T., Potempa J. (1997). *Porphyromonas gingivalis* proteinases as virulence factors in the development of periodontitis. *J Periodont Res.* 32: 120-125.

Umeda, M., Chen, C., Bakker I., Contreras, A., Morrison, J., Slots, J. (1998). Risk indicators for arboring periodontal pathogens. *J.Periodontol.* 69: 111-118.

van Winkelhoff A., Herrera D., Oteo A., Sanz M. (2005). Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in the Netherlands and Spain. *J. Clin Periodonto.* 32: 893-898.

van Winkelhoff A., Kippuw N., De Graaff J. (1985). Serological characterization of black-pigmented *Bacteroides endodontalis*. *Infect. Immun.* 51: 972-974.

van Winkelhoff A., Rams, T., Slots, J. (1996). Systemic antibiotic therapy in periodontics, *Periodontal 2000.* 10: 45-78.

van Winkelhoff A., Winkel E., Barendregt D., *et al.* (1997).  $\beta$ -lactamase producing bacteria in adult periodontitis. *J. Clin Periodontol*, 24: 538-543.

Wade W.G. (2013) The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological Research* 69: 137– 143.

Walker C., Gordon J. (1990). The effect of clindamycin on the microbiota associated with refractory periodontitis. *J Periodontol.*, 61: 692-698.

Walker C., Gordon J., Cornwall H., Murphy J., Socransky, S. (1981) Gingival crevicular fluid levels of clindamycin compared with its minimal inhibitory concentrations for periodontal bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.*, 19:867-871.

Walker C.B. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol.* 2000 10:79–88.

Walker, C.B. (1996) The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal pathogens. *Periodontol.* 2000: 79-88.

Williams J. (1999).  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Inter. J. Antimicrob. Agents.* 12: 3-7.

Wilson, M. (2001). Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress.* 84: 235-254.

Wybo I., Pierard D., Verschraegen I., Reynders M., Vandoorslaer K., Claeys G. *et al.*, (2007). Third Belgian multicenter survey of antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* 59: 132-139.

Ximenés-Fyvie L., Hafajee A., Socransky S. (2000). Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 27: 648-657.

Yousefi-Mashouf R. Duerden B., (1992) An Identification Scheme for Oral Non-pigmented *Prevotella* (Bacteroides) Species. *Microbial Ecology in health and disease.* 5: 31-41.

Yousefi-Mashouf R., Duerden B., Eley A., Rawlinson A. (1993) Incidence and Distribution of Non-pigmented *Prevotella* Species in Periodontal Pockets Before and After Periodontal Therapy. *Microbial Ecology in health and disease.* 6: 35-42.

Zambon J., Nisengard R. (2007) Bactérias produtoras de pigmento negro. Cap. 16. *In: Bacteriologia geral.* Guanabara-Koogan. Rio de Janeiro.

Zaura E. Koopman J.E., Fernandez-Mostajo M, Crielaard W (2009) The oral microbiome. In “*The human microbiota and microbiome*” Edited by Marchesi J.R pp 20-31.



## VII. ANEXOS

### 1. Comunicações (sob a forma de poster) apresentadas em congressos internacionais

(a) **2011:** Cunha, S.; Silva, R.; Sousa, J.C.; Cardoso, I.L.; Pina, C. “Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas* and *Prevotella* species isolated from periodontitis infections in north of Portugal”. IV Conferência Internacional sobre Meio Ambiente, Industrial e Microbiologia Aplicada (BioMicroWorld2011), Málaga, Espanha, 2011.

(b) **2012:** Cardoso, I.L.; Cunha, S.; Silva, R.; Sousa, J.C.; Pina, C. “Resistance of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* isolated from periodontitis infections in the north of Portugal - Myth or Reality?” European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) 2012, Londres, Reino Unido.

### 2. Artigo

Pina, C.; **Cunha, S.**; Silva, R.; Sousa, J.C.; Cardoso, I.L. 2012. "Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas* and *Prevotella* species isolated from periodontitis infections in the north of Portugal. "In: *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*, 000: 492 - 494.

# Resistance of *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* isolated from periodontitis infections in the north of Portugal – Myth or reality?

I. Lopes Cardoso \*, S. Cunha, R. Silva, J.C. Sousa, C. Pina  
\*mic@ufp.edu.pt

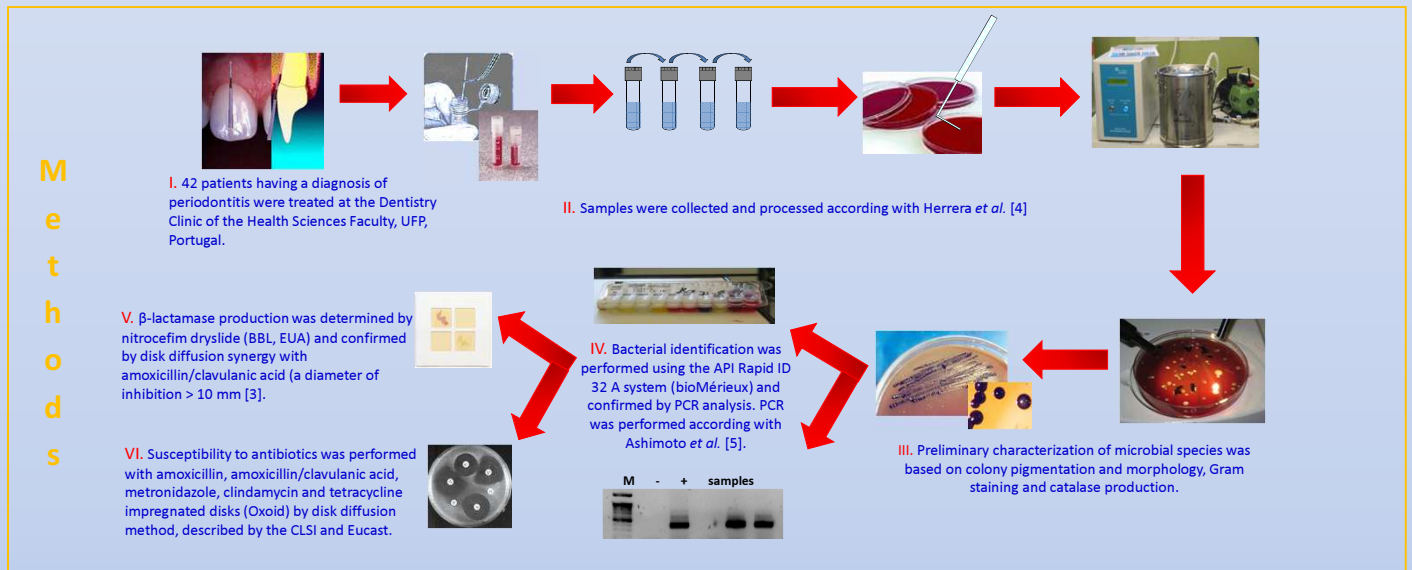
Health Sciences Faculty, Fernando Pessoa University, Rua Carlos da Maia 296, 4200-150, Porto, Portugal.

## Introduction and Purpose

Periodontitis is one of the most common diseases in dentistry and results from the accumulation of bacterial biofilm on the tooth surface. Black-pigmented, gram negative oral anaerobes such as *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* are thought to be pathogens in adult periodontitis [1, 2]. Odontogenic local infections require surgical treatment and, if required, a probabilistic antibiotherapy is needed that is effective on most recognized oral pathogens [3]. In most cases, antibiotic prescription is empirical and based on the clinical condition of the patient.

Reports from different countries show an increasing prevalence of patients with oral and subgingival  $\beta$ -lactamase producing bacteria. However, in Portugal there is no data concerning antibiotic resistance of oral flora.

The **main goal of this study** was to identify *Porphyromonas* and *Prevotella* species from periodontal pockets of Portuguese adults suffering of periodontitis infections and to test their *in vitro*  $\beta$ -lactamase production. Moreover, susceptibility of these bacterial species to five antibiotics commonly prescribed in treatment or prophylaxis on odontology in Portugal was also under study.



## Results

In this study *Prevotella intermedia* represented 44% and *Porphyromonas gingivalis* 20% of total isolates, with a good correlation between employed methods. The remaining 36% strains belonged to other black-pigmented species (Table 1). These results were in accordance with several authors, which report that *P. intermedia* and *P. gingivalis* are commonly isolated from periodontitis infections being considered the most abundant putative black pigmented species [1, 3, 6].

Concerning  $\beta$ -lactamase production, only 2% of other *Prevotella* sp. showed  $\beta$ -lactamase production with resistance to amoxicillin and susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid disks. The remaining strains showed no  $\beta$ -lactamase production (Table 1). Results from the disk diffusion method were confirmed by nitrocefin disks. These results are not in agreement with most published studies that report a high level of  $\beta$ -lactamase production among *P. intermedia* and *P. gingivalis* [7, 8]. However, some studies have also reported lower prevalences [3, 9].

In our study, both tested species were susceptible to all tested antibiotics (amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, metronidazole, clindamycin and tetracycline) (Table 1).

**Table 1-** Results obtained in the identification of isolated strains using API and PCR, in the detection of  $\beta$ -lactamase activity assay and in the antibiotic susceptibility test.

Species	N.º (%) identified by API and PCR	N.º (%) $\beta$ -lactamase positive strains	Antibiotic resistance *
<i>Prevotella intermedia</i>	18 (44%)	0 (0%)	0%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	9 (20%)	0 (0%)	0%
Other black pigmented sp.	14 (36%)	3 (2%)	2%

\* Five antibiotic tested diffusion method: amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, metronidazole, clindamycin and tetracycline.

## Conclusion

1. The most frequently isolated anaerobic species from periodontal pockets was *Prevotella intermedia*.
2. A low number of  $\beta$ -lactamase producing strains was detected.
3. The majority of *P. intermedia* and all *P. gingivalis* isolates were susceptible to all tested antibiotics.

These results are not in accordance with most studies of other countries that showed high levels of resistance among anaerobes. The various frequencies observed in other reports could be explained by geographical differences and divergences in sampling [3, 8]. Moreover, the lack of reported data in some countries, such as Portugal, could explain our results. The lack of standardization of *in vitro* susceptibility testing of anaerobic bacteria and divergence in testing conditions and criteria of interpretation used by different laboratories are some of the current clinical problems that could also explain these results.

Further studies will be required where antibiotic resistance genes coding for  $\beta$ -lactamases will be screened.

## References

- [1] Andrés M.T., Chung W.O., Roberts M.C., Fierro J.F. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(11): 3022-3023.
- [2] Gatignol J.P., Poulet P.P., Desse T., Duffaut D. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis.* 2003; 22: 389-391.
- [3] Fosse T., Madinier I., Hitzig C., Charbit Y. *Oral Microb and Immunol.* 1999; 14: 352-357.
- [4] Herrera D., van Winkelhoff A.J., Dellelijjn-Kippuv N., Winkel E.G., Sanz M. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 520-525.
- [5] Ashimoto A., Chen C., Bakker I., Slots J. *Oral Microbiol Immunol.* 1996; 11: 266-273.
- [6] Handal T., Caugant D.A., Olsen I. *Antimicrob Ag and Chemother.* 2003; 47(4): 1443-1446.
- [7] Maestre J.R., Bascones A., Sánchez P., Matesanz P., Aguilar L., Giménez M.J., Pérez-Balcaabao I., Granozo J.J., Prieto J. *Rev Esp. Quimioter.* 2007; 20(1): 61-67.
- [8] Dubreuil L., Behra-Miellat J., Vouillot C., Bland S., Sedallian A., Mory F. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 21: 267-273.
- [9] Mättö J., Asikainen S., Väisänen M.L., von Troil-Lindén B., Könönen E., Saarela M., Salminen K., Finegold S.M., Jousimies-Somer H. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1999; 43(10): 2383-2388.

# Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas* and *Prevotella* species isolated from periodontitis infections in the north of Portugal

C. Pina\*, S. Cunha, R. Silva, J. C. Sousa and I. Lopes Cardoso

Health Sciences Faculty, Fernando Pessoa University, Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto

\*Corresponding author: [cpina@ufp.edu.pt](mailto:cpina@ufp.edu.pt)

The main goal of this study was to identify *Porphyromonas* and *Prevotella* species from periodontal pockets of Portuguese adults suffering from periodontitis infections. Results showed that *Prevotella intermedia* represented 44% and *Porphyromonas gingivalis* 20% of total isolates. The remaining 36% strains belonged to other black-pigmented species.

The isolated bacterial species were further tested for their  $\beta$ -lactamase production. Results from the disk diffusion method were confirmed by nitrocefin disks and showed no  $\beta$ -lactamase production by *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* strains. Only 2% of other *Prevotella* sp. showed  $\beta$ -lactamase production.

Moreover, we studied the susceptibility of these bacterial species to five antibiotics commonly prescribed as treatment or prophylaxis in odontology in Portugal. The isolated strains showed susceptibility to all tested antibiotics.

**Keywords** Antimicrobial susceptibilities; *Porphyromonas* sp.; *Prevotella* sp.

## 1. Introduction

Periodontitis is one of the most common diseases in dentistry and results from the accumulation of bacterial biofilm on the tooth surface. Black-pigmented, gram negative oral anaerobes such as *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* are thought to be pathogens in adult periodontitis [1, 2]. These bacteria are frequently isolated from patients under periodontitis treatment. Odontogenic local infections require surgical treatment and, if required, a probabilistic antibiotherapy is needed that is effective on most recognized oral pathogens [3]. In most cases, antibiotic prescription is empirical and based on the clinical condition of the patient. As a result, treatment is often inappropriate and leads to the development of bacterial resistance and even multiple resistances [4]. Antibiotic resistance has become a serious problem in nowadays medical and dental practice. Anaerobes are naturally resistant to aminoglycosides, but they are increasingly resistant to antibiotics as their use has become widespread, especially to  $\beta$ -lactam compounds.  $\beta$ -lactamases are the major cause of bacterial resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics and, for this reason, have been under extensive microbiological, biochemical and genetic investigations [3]. Reports from different countries show an increasing prevalence of patients with oral and subgingival  $\beta$ -lactamase producing bacteria. The use of antibiotics (defined as daily doses/100 000 inhabitants) was significantly higher in Mediterranean countries than in the rest of Europe [5, 6]. However, in Portugal there is no data concerning antibiotic resistance of oral flora. The determination of *in vitro* antimicrobial susceptibility can be important in certain situations, for example, to monitor patterns of susceptibility and resistance in the population and to help in the selection of the appropriate antibiotic in dentistry treatment [7].

The main goal of this study was to identify *Porphyromonas* and *Prevotella* species from periodontal pockets of Portuguese adults suffering of periodontitis infections and to test their *in vitro*  $\beta$ -lactamase production. Moreover, susceptibility of these bacterial species to five antibiotics commonly prescribed in treatment or prophylaxis of odontology in Portugal was also under study.

## 2. Materials and Methods

### Patients and microbiological procedures

This study was based on 42 patients treated at the Dentistry Clinic of the Health Sciences Faculty, Fernando Pessoa University, Porto, Portugal, from January to July 2010. Adult patients with 35 to 75 years old, having a diagnosis of periodontitis and that did not receive antimicrobial therapy in the previous 30 days were included in the study. Sampling was performed with aseptic surgical techniques. Samples were collected according with Herrera *et al.* [6] using four sequential sterile paper points inserted into the subgingival sulcus after cleaning the supragingival plaque, and held in place for 60 s. A sterilized prerduced transport fluid (RTF) was used to transport samples to the laboratory where they were immediately processed. Isolation of black pigmented bacteria was performed using culture procedures: samples were vortexed for 60 s and diluted in PBS solution using a 10-fold serial dilution to  $10^{-3}$ . A volume of 100  $\mu$ L of each dilution was spread on non-selective 5% horse blood agar plates enriched with hemin (5mg/L) and vitamin K (1mg/L). Incubation was performed at 37°C

in an anaerobic atmosphere by Macs Mics (Whitley Jar Gassing System). Plates were read at days 7 and 14. Preliminary characterization of microbial species was based on colony pigmentation and morphology, Gram staining and catalase production. Bacterial identification was performed using the API Rapid ID 32 A system (bioMérieux) and confirmed by PCR analysis.

### PCR analysis

DNA was extracted as described by [8] from 500 µL of glycerol suspension culture of each isolated strain. The culture was centrifuged at 6000 rpm for 10 minutes. Supernatant was discarded and pellet suspended in 200 µL of ultrapure water. Solution was boiled for 10 minutes, cooled on ice and then centrifuged at 12000 rpm for 10 minutes. Supernatant was discarded again and pellet resuspended in 200 µL of ultrapure water and latter used for PCR.

DNA (5 µL) was amplified in a reaction mixture containing 5 µL of 5x PCR buffer, 2,5 µL of MgCl<sub>2</sub> 25mM, 1 µL of dNTP mixture 0,2 mM, 1 µL of each primer 0,4 µM and 0,5 µL Taq polymerase in a total volume of 25 µL [8].

Primers used for identification of *Porphyromonas gingivalis* were 5'-AGC CAG CTT GCC ATA CTG CG-3' and 5'-ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT-3' [8], resulting in a PCR product of 404 bp. PCR was performed according with Ashimoto *et al.* [8] as followed: 5 minutes at 94°C; 30 cycles consisting of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 60°C and 30 seconds at 72°C; final extension for 10 minutes at 72°C.

Primers used for identification of *Prevotella intermedia* were 5'-TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG-3' and 5'-TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T-3' [8], resulting in a PCR product of 575 bp. PCR was performed according with Ashimoto *et al.* [8] as followed: 5 minutes at 94°C; 30 cycles consisting of 30 seconds at 94°C, 30 seconds at 55°C and 30 seconds at 72°C; final extension for 10 minutes at 72°C.

PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel. Control strains used in PCR analysis were *Prevotella intermedia* ATCC 25611 and *Porphyromonas gingivalis* ACTT 33277.

### Detection of β-lactamase activity

β-lactamase activity was performed on a single colony, using the nitrocefim dryslide test (BBL, EUA). According to manufacturer's recommendations, disks that did not change from yellow to red within 15 minutes at room temperature were incubated for 1 hour at 37°C. β-lactamase positive strains were confirmed by the disk diffusion synergy test between amoxicillin and clavulanic acid, having a diameter of inhibition > 10 mm [3].

### Antibiotic susceptibility assay

Five antibiotics commonly prescribed in periodontitis infections were chosen for this assay: amoxicillin (10µg), amoxicillin/clavulanic acid (30µg), metronidazole (5µg), clindamycin (2µg) and tetracycline (30µg). Antibiotic susceptibility was performed with impregnated disks (Oxoid) using the disk diffusion method, described by the CLSI and Eucast. This technique was performed in the same medium previously described. Plates were streaked with a McFarland 1 inoculum (suspension prepared from fresh colonies) using a cotton swab and disks were placed onto inoculated plates. One disk of respective antibiotic was placed in the middle of each plate and later incubated under anaerobic conditions at 37°C. Plates were read on days 2 and 7.

## 3. Results and Discussion

Isolated black pigmented bacterial strains were identified by conventional and molecular techniques. Table 1 presents results obtained using both methods.

**Table 1** Results obtained in the identification of isolated strains using API and PCR, in the detection of β-lactamase activity and in the antibiotic susceptibility test.

Species	N.º (%) identified by API and PCR	N.º (%) β-lactamase positive strains	Antibiotic resistance *
<i>Prevotella intermedia</i>	18 (44%)	0 (0%)	0%
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	9 (20%)	0 (0%)	0%
Other black pigmented sp.	14 (36%)	3 (2%)	2%

\*Five antibiotic tested: amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, metronidazole, clindamycin and tetracycline.

In this study the *Prevotella intermedia* represented 44% and *Porphyromonas gingivalis* 20% of total isolates, with a good correlation between employed methods. The remaining 36% strains belonged to other black-pigmented species (Table 1). These results were in accordance with several authors, which report that *P. intermedia* and *P. gingivalis* are commonly isolated from periodontitis infections being considered the most

abundant putative black pigmented species [1, 3, 9]. When considering isolates from patients with periodontal disease, *Prevotella* sp. has been the most prevalent anaerobe isolate [10].

Concerning  $\beta$ -lactamase production, only 2% of other *Prevotella* sp. showed  $\beta$ -lactamase production with resistance to amoxicillin and susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid disks. The remaining strains showed no  $\beta$ -lactamase production (Table 1). Results from the disk diffusion method were confirmed by nitrocefin disks. These results are not in agreement with most published studies that report a high level of  $\beta$ -lactamase production among *P. intermedia* and *P. gingivalis* [10, 11]. However, some studies have also reported lower prevalences [3, 12]. The various frequencies observed in other reports could be explained by geographical differences and divergences in sampling [3, 11]. Moreover, the lack of reported data in some countries, such as Portugal, could explain our results.

*P. intermedia* and *P. gingivalis* are usually resistant to antiseptics and antibiotics. However, antibiotics such as metronidazol, azithromycin and  $\beta$ -lactam antibiotics plus  $\beta$ -lactamase inhibitors, are still generally active against *Prevotella* and *Porphyromonas* species [1]. In our study, both tested species were susceptible to all tested antibiotics (amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, metronidazole, clindamycin and tetracycline) (Table 1). These results are not in accordance with most studies of other countries that showed high levels of resistance among anaerobes. This can be explained by the lack of standardization of *in vitro* susceptibility testing of anaerobic bacteria. Divergence in testing conditions and criteria of interpretation used by different laboratories are some of the current clinical problems [13].

## 4. Conclusion

The most frequently isolated anaerobic species from periodontal pockets was *Prevotella intermedia*. A low number of  $\beta$ -lactamase producing strains was detected. The majority of *P. intermedia* and all *P. gingivalis* isolates were susceptible to all tested antibiotics. These results are not in accordance with most studies of other countries that showed high levels of resistance among anaerobes. Further studies will be required where antibiotic resistance genes coding for  $\beta$ -lactamases will be screened.

## References

- [1] Andrés M.T., Chung W.O., Roberts M.C., Fierro J.F. Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* spp. isolated in Spain. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1998; 42(11): 3022-3023.
- [2] Gatignol J.P., Poulet P.P., Desse T., Duffaut D. Comparison of laboratory methods for detecting  $\beta$ -lactamase positive strains in the species *Prevotella intermedia* sensu lato isolated from periodontal pockets. *European Journal Clinical Microbiological Infections Disease*. 2003; 22: 389-391.
- [3] Fosse T., Madinier I., Hitzig C., Charbit Y. Prevalence of  $\beta$ -lactamase-producing strains among 149 anaerobic gram-negative rods isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiology and Immunology*. 1999; 14: 352-357.
- [4] Salinas M.B., Riu N.C., Aytés L.B., Escoda C.G. Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. *Medical Oral Patology Oral Curgical Bucal*. 2006; 11: E70-E75.
- [5] Van Winkelhoff A.J., Winkel E.G. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontology 2000*. 2005; 39: 40-52.
- [6] Herrera D., van Winkelhoff A.J., Delleimijn-Kippuv N., Winkel E.G., Sanz M.  $\beta$ -lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *Journal of Clinical Periodontology*. 2000; 27: 520-525.
- [7] Jacinto R.C., Gomes B.P.F.A., Shah H.N., Ferraz C.C. Zaia A.A., Souza-Filho F.J. Incidence and antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *International Endodontic Journal*. 2006; 39: 62-70.
- [8] Ashimoto A., Chen C., Bakker I., Slots J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions, *Oral Microbiology Immunology*. 1996; 11: 266-273.
- [9] Handal T., Caugant D.A., Olsen I. Antibiotic resistance in bacteria isolated from subgingival plaque in the Norwegian population with refractory marginal periodontitis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003; 47(4): 1443-1446.
- [10] Maestre J.R., Bascones A., Sánchez P., Matesanz P., Aguilar L., Giménez M.J., Pérez-Balcaño I., Granizo J.J., Prieto J. Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Review Esp. Quimioterapia*. 2007; 20(1): 61-67.
- [11] Dubreuil L., Behra-Mielliet J., Vouillot C., Bland S., Sedallian A., Mory F.  $\beta$ -lactamase production in *Prevotella* and *in vitro* susceptibilities to selected  $\beta$ -lactam antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003; 21: 267-273.
- [12] Mättö J., Asikainen S., Väisänen M.L., von Troil-Lindén B., Könönen E., Saarela M., Salminen K., Finegold S.M., Jousimies-Somer H.  $\beta$ -lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella pallens* genotypes and *in vitro* susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999; 43(10): 2383-2388.
- [13] Falagas M.E., Siakavellas E. Bacteroides, *Prevotella* and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000; 15: 1-9.