

Helena Isabel Gomes de Araújo

Periodontite: Clínica, Diagnóstico e Tratamento

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

PORTO, 2008

Helena Isabel Gomes de Araújo

Periodontite: Clínica, Diagnóstico e Tratamento

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa
como parte dos requisitos para a obtenção do
grau de licenciatura em Medicina Dentária

Helena Isabel Gomes de Araújo

PORTO, 2008

Agradecimentos

Aos meus queridos pais pelo carinho, amor, incentivo, formação e educação.

Ao meu namorado: tão único, sempre presente, carinhoso e compreensivo. Um beijo.

Ao Professor Doutor João Carlos Sousa, meu orientador: foi para mim uma honra ter tão ilustre e prestigiado professor a orientar o meu trabalho. O meu muito obrigada pela amizade, disponibilidade e dedicação que demonstrou ao longo deste trabalho.

Aos meus amigos especiais: Frederica Benedito, Jorge Rodrigues, Ricardo Vasconcelos (meu binómio) que me acompanharam ao longo destes 6 anos com tanto companheirismo e amizade.

Aos professores da Universidade Fernando Pessoa, que mais contribuíram para a minha formação, inculcando o gosto que adquiri pela minha profissão.

A todos aqueles que me esqueci de mencionar, e que, foram porventura, tão ou mais importantes que todos os outros.

RESUMO

A cavidade oral constitui a primeira parte do tracto gastrointestinal, e apresenta uma série de características que a converte num habitat microbiologicamente distinto. As características ecológicas das diferentes superfícies encontradas na cavidade bucal, tornam-na um habitat microbiano único no corpo humano (Ellen e Kuramitsu, 2000). A placa bacteriana pode ser definida como uma película não calcificada, apresentando uma forte adesão às superfícies dentárias, sendo predominantemente constituída por reservatórios bacterianos e componentes salivares, com crescimento contínuo. Esta placa bacteriana é hoje em dia considerada como das principais causas de doenças como a cárie e periodontite. O objectivo deste trabalho foi avaliar através da revisão da literatura, a participação bacteriana em diferentes condições periodontais e veículos de combate a essas mesmas bactérias, incluindo as formas resistentes. A microflora oral é composta predominantemente por bactérias, no entanto podem também encontrar-se fungos, vírus, protozoários e até mesmo *archaea*. É estimado que mais de 700 espécies cultiváveis e não cultiváveis estejam presentes nesta cavidade (Pennisi, 2005). O domínio bacteriano no que respeita a este âmbito foca-se em espécies Gram positivo, do Género *Streptococcus* e *Actinomyces*, e de Gram negativo como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Capnocytophaga*, *Neisseria* e *Veillonella spp.* Na gengivite, destaca-se a presença de microrganismos Gram positivo como *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, *Peptostreptococcus micros* e Gram-negativo como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Haemophilus* e *Campylobacter spp.* Na periodontite evidenciam-se elevadas proporções de *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema* e *Eubacterium spp.* Pode concluir-se que a microbiota presente na cavidade bucal é variável e reflecte a condição periodontal. Várias são as técnicas microbiológicas de diagnóstico (cultura bacteriana, ensaios imunológicos e enzimáticos, microscopia de campo escuro e contraste de fase e marcadores bioquímicos) utilizadas para a detecção dos patogénicos citados, no entanto os resultados encontrados apontam para a necessidade de uma análise criteriosa na selecção do teste a ser empregue.

Mundialmente a resistência aos antibióticos entre a microbiota oral é um problema crescente e as informações relativas a tal resistência são escassas. Existe assim uma necessidade urgente de formular uma estratégia de acção para avaliar o desenvolvimento de resistências, conservando a eficácia dos antimicrobianos, plano este baseado na prevenção de doenças transmissíveis e no controlo das infecções.

O diagnóstico laboratorial das infecções da cavidade oral por métodos clássicos é moroso e não permite dar respostas atempadas. Estes métodos não constituem uma alternativa viável e por isso o diagnóstico clínico e respectivo tratamento é feito empiricamente. Os métodos de Biologia Molecular nomeadamente a sequenciação do gene 16S rRNA e a detecção de genes de resistência aos diferentes grupos de antibióticos, permitem agilizar o diagnóstico clínico das infecções da cavidade oral e modificar o comportamento clínico face a estas infecções. Na nossa opinião é este o caminho a adoptar para o tratamento das periodontites.

I. ÍNDICE GERAL

II. Introdução.	1
III. Periodontite e Microbiologia Oral.....	6
IV. Métodos de Diagnóstico Laboratorial	16
i. Microscopia de Campo Escuro e Contraste de Fase	17
ii. Exames Culturais em Aerobiose e Anaerobiose.....	17
iii. Ensaio Enzimático - BANA	18
iv. Marcadores Bioquímicos	19
v. Técnicas imunológicas.....	19
vi. Análise de DNA e RNA	21
A. Sondas de DNA	21
B. Polimerase Chain Reaction	22
C. Sequenciação do gene 16s rRNA	24
D. Susceptibilidade Agentes Etiológicos Das Periodontites Aos Antibióticos. ...	24
V. Antibióticos e Antimicrobianos	26
i. Antibióticos na prática Odontológica: Considerações Gerais	27
a. Agentes β -Lactâmicos.....	29
b. Metronidazol	32
c. Tetraciclina	33
d. Macrólidos e Lincosamidas	35
VI. Resistência Bacteriana.	38
i. Resistência Natural	38
ii. Resistência Adquirida	39
iii. Mecanismos de resistência aos antibióticos	41
iv. Usos de antibióticos vs desenvolvimento de resistência.	42
VII. Conclusão.	45
VIII. Referências Bibliográficas.	51

I. ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS

Figura 1- Ilustração da doença Periodontal avançada	1
Figura 2 - Microscopia electrónica dos streptococcus aderidos à mucosa oral.....	4
Figura 3 - Doença periodontal.	7
Figura 4 – Gengivite (a). Periodontite (b).....	9
Figura 5 - Perfis de colonização bacteriana	14
Figura 6 - Panela <i>Gaspak</i> com ambiente anaeróbio.....	18
Figura 7 - Hibridação de DNA alvo com sondas marcadas de DNA	22
Figura 8 - Esquema da reacção de amplificação de DNA por PCR	23
Figura 9 – Exemplo de testes para o antibiograma	25
Figura 10- <i>Penicillium notatum</i> produtor de penicilina.....	26
Figura 11- As quatro classes antibióticos β -lactâmicos.....	29
Figura 12- Mecanismo de acção dos β -lactâmicos.	30
Figura 13- Inactivação dos β -lactâmicos por β -lactamases.	30

Figura 14- As aminopenicilinas associadas a inibidores das β -lactamases31

Figura 15 – Melhor absorção oral de amoxicilina versus ampicilina.....31

Figura 16- Estrutura química de metronidazol.32

Figura 17 - Estrutura química das tetraciclinas.....33

Figura 18- Efeitos fototóxicos das tetraciclinas.35

Figura 19- Estrutura química dos macrólidos e lincosamidas.....35

Figura 20 – Mecanismos de transferência de genes de resistência aos antibióticos.....40

II. ÍNDICE DE TABELAS

TABELAS

Tabela 1: Associação entre a doença Periodontal e algumas Patologias Sistémicas.....15

Tabela 2: Síntese dos mecanismos de acção, espectro antimicrobiano e principais mecanismos de resistência dos principais agentes antimicrobianos utilizados em medicina dentária.37

II. INTRODUÇÃO

O quadro clínico dos tecidos gengivais saudáveis apresenta-se com uma coloração pálida, tendo a sua superfície um aspecto granuloso e um tom consistente. A natureza insidiosa da doença periodontal é indicada pela ocorrência de uma inflamação gengival podendo mesmo levar à perda parcial ou completa dos dentes (McDonald *et al*, 1995).

A doença periodontal representa assim um grupo de doenças inflamatórias de natureza multifactorial que se desenvolve em resposta à presença de bactérias específicas. Em termos clínicos caracteriza-se como uma doença inflamatória da gengiva e dos tecidos periodontais profundos, que pode implicar a destruição do osso alveolar de suporte (Fig. 1).

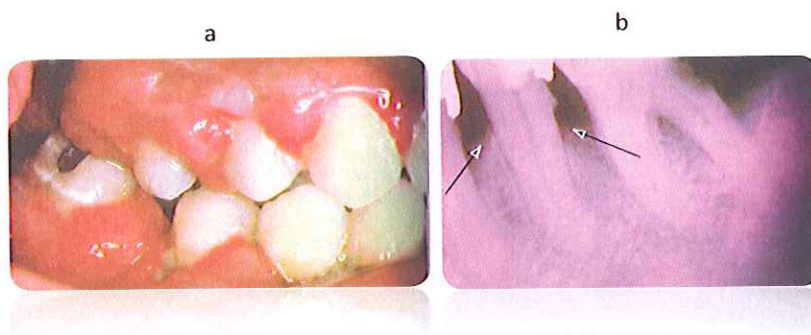


Fig. 1 – Ilustração da Doença Periodontal avançada. (a) Uma inflamação severa poderá levar à (b) perda de osso causando uma eventual perda dentária. (Adaptado de: Nester *et al*, 2000).

O conceito actual de etiologia multifactorial no que concerne às doenças periodontais encerra o hospedeiro como a componente fundamental. De facto o conhecimento relativo à etiologia, patogenicidade e tratamento das periodontopatologias sofreu um forte incremento com os estudos no âmbito dos factores relacionados com o hospedeiro, incluindo as suas características genéticas e os seus mecanismos de resposta

imunológica. Na verdade, os efeitos deletérios e, possivelmente, mais importantes poderão estar relacionados com a própria resposta imune do hospedeiro aos antígenos apresentados pelos microrganismos e a problemática da incidência, cada vez mais alargada, de bactérias resistentes aos fármacos comumente administrados. Ainda que não existam muitas evidências de que as condições sistêmicas constituam os factores primários na etiologia da doença periodontal, estas seguramente contribuem para a alteração da saúde periodontal (Toledo, 1996). Contudo, muitos investigadores evidenciaram a importância dos microrganismos na instauração e progressão da doença periodontal (Slots, 1977, Socransky *et al.*, 1988, Dahlén *et al.*, 1992 e Ximenez-Fyvie *et al.*, 2000).

No que respeita à prevalência e à severidade da doença, estas aumentam com a idade, reflectido pela perda do osso alveolar (Newman *et al.*, 1978). Embora a placa bacteriana seja essencial para o início e para a progressão da periodontite, a quantidade e os tipos de bactérias presentes não são suficientes para explicar as diferenças no que respeita ao grau de severidade da doença.

A placa bacteriana pode ser definida como uma película não calcificada, que apresenta forte adesão às superfícies dentárias, resistindo desta forma à presença do fluxo salivar. O termo biofilme é usado para denominar uma comunidade microbiana estruturada, suspensa numa matriz exopolissacarídica, que adere a uma superfície (Wilson, 2001). A associação dos microrganismos em biofilmes constitui uma forma de protecção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sua sobrevivência em ambientes hostis. O biofilme constitui deste modo um depósito bacteriano e de constituintes salivares, com um crescimento contínuo, sendo considerado a principal causa de doenças como a cárie e a periodontite, infecções peri-implantares e estomatites (Rosan e Lamont, 2000).

A arquitectura microscópica da placa bacteriana já está bem definida. Caracteriza-se pela sua permeabilidade devido à sua porosidade, permitindo assim que a saliva, o fluido gengival e os fluidos da dieta alimentar se infiltrem na mesma (Genco *et al*, 1997). O facto de os microrganismos estarem envolvidos na etiologia da doença periodontal tem sido alvo de estudo por inúmeros investigadores, no entanto, a identificação completa de todos agentes microbianos envolvidos com esta doença ainda não está totalmente definida. Estima-se que aproximadamente 500 espécies bacterianas habitem a cavidade bucal (Moore e Moore, 1994; Socransky e Haffajee, 1994 e Wilson *et al*, 1997), sendo a maioria destas comensais e uma pequena porção patogénicas oportunistas, causadoras também de doenças sistémicas (Paster *et al.*, 2001). Segundo Marsh *et al.* (1994), a composição da placa bacteriana pode permanecer estável devido a uma variedade de interacções entre as espécies constituintes. Tem também sido sugerido que a placa supragengival pode afectar a composição da placa subgengival pelo facto de poder facultar nutrientes, mantendo desta forma o meio anaeróbio e facilitando a união de microrganismos (Kornman, 1986). A primeira apresenta espécies bacterianas morfologicamente distintas da superfície dentária e a segunda é frequentemente caracterizada por uma zona de bactérias de Gram negativo (Listgarten, 1994).

As bactérias que colonizam as superfícies dentárias são predominantemente microrganismos Gram positivo facultativos, como o *Actinomyces viscosus* e o *Streptococcus sanguis*. Estes aderem à película dentária (Fig. 2) através de adesinas, que interagem com receptores específicos. Outros mecanismos determinantes na selectividade da colonização na película dentária incluem as adesinas fimbriais, estruturas presentes na superfície de certas bactérias como o *Actinobacillus viscosus*, que auxiliam na aderência bacteriana inicial (Cardoso e Gonçalves, 2002).

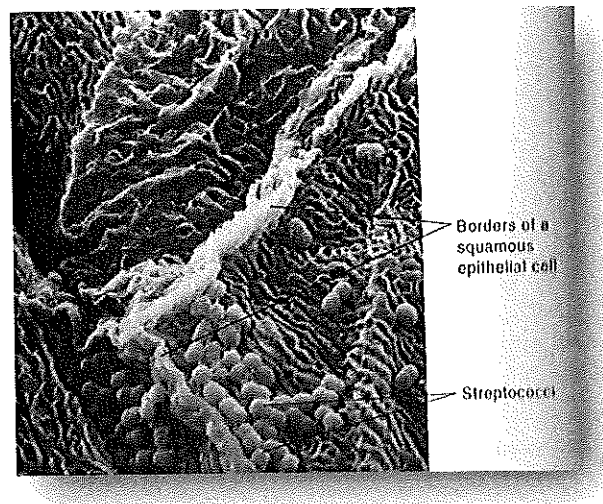


Fig. 2 - Microscopia electrónica dos *Streptococcus* aderidos à mucosa oral. (Adaptado de: Nester *et al*, 2000).

Relativamente à sucessão ecológica da placa bacteriana ocorre uma transição do meio ambiente aeróbio, inicialmente caracterizado por bactérias facultativas Gram-positivo, para um meio com escassez de oxigénio, com o predomínio de microrganismos anaeróbios Gram negativo. Já os factores de virulência da placa bacteriana dependem da presença ou do aumento de microrganismos específicos, que produzem substâncias que intervêm a destruição dos tecidos do hospedeiro (Loesche e Syed, 1978).

No entanto, e apesar da diversidade da comunidade de microrganismos encontrados no interior da cavidade oral, ela é caracterizada por um elevado grau de estabilidade – homeostase microbiana (Ellen e Kuramitsu, 2000). Este equilíbrio é mantido, apesar dos mecanismos de defesa do hospedeiro e das tensões ambientais existentes, tais como, as mudanças do fluxo salivar, a dieta alimentar, as práticas

regulares de higiene oral, e a exposição a agentes antimicrobianos. Assim é de grande importância a manutenção desta estabilidade uma vez que garante que agentes potencialmente nocivos permaneçam em número reduzido (Ellen e Kuramitsu, 2000).

Em 1988, Socransky e seus investigadores, concluíram que as interações microbianas são importantes nas diferentes condições periodontais, podendo assim resultar em saúde ou doença periodontal. Parece provável que certas associações possam favorecer a colonização de espécies potencialmente virulentas (associação positiva), ou ainda, serem antagonistas a esta colonização (associação negativa). Em 1996, Zambon descreveu os factores microbianos associados às doenças periodontais, considerando o epitélio e o fluxo do fluido gengival como factores de protecção do hospedeiro, a imunidade celular e a rápida reposição dos tecidos como meios que dificultam a fixação dos possíveis periodontopatogénicos.

Diversos exames microbiológicos podem ser aplicados no reconhecimento da placa bacteriana, destacando-se entre elas as técnicas de microbiologia clássica: microscopia óptica e electrónica e a cultura bacteriana em meios de cultura distintos, os testes imunológicos e as técnicas de Biologia Molecular (Paster *et al.*, 2001).

O objectivo deste trabalho foi avaliar através de revisão bibliográfica, a participação bacteriana em diferentes condições periodontais, os principais ensaios microbiológicos empregues em periodontia para a análise dos componentes da microbiota subgengival, bem como a implicação/aplicação de fármacos afectos a estas doenças e seu perfil de susceptibilidade.

III. PERIODONTITE E MICROBIOLOGIA ORAL

A Doença Periodontal (DP) é uma infecção crónica, produzida por bactérias de Gram negativo, com níveis de prevalência elevados (Petersen e Ogawa, 2005), sendo considerada a segunda maior causa de patologias dentária. É então definida como uma doença multifactorial, que evolui continuamente, resultando numa resposta inflamatória e imune do hospedeiro à presença de bactérias e aos seus produtos.

A sua progressão é favorecida pelas características morfológicas dos tecidos afectados, o que a distingue de outras doenças infecciosas (Lindhe *et al.*, 2003). As manifestações clínicas da doença estão estritamente dependentes das propriedades agressoras dos microrganismos e da capacidade de reacção do hospedeiro à agressão.

Embora o mecanismo de defesa mais importante resida na resposta inflamatória que se manifesta inicialmente como gengivite, as variações na eficácia protectora do processo inflamatório e a patogenicidade das bactérias podem ser causas fundamentais nas diferenças encontradas relativamente à susceptibilidade do indivíduo à Doença Periodontal. O processo inflamatório desencadeado pode culminar com a instalação de uma periodontite. Inicialmente ocorre um desequilíbrio entre os microrganismos e as defesas do hospedeiro que acarreta alterações vasculares e formação de inflamação. Clinicamente, esta fase pode manifestar-se com uma alteração da cor da gengiva, hemorragia e edema, sendo uma situação reversível se a sua causa for eliminada. Esta situação, definida como Gengivite, promove a fragilização das estruturas, o que possibilita um maior acesso dos agentes bacterianos agressores e/ou dos seus produtos às áreas subjacentes, podendo resultar na formação de bolsas periodontais, com perda óssea e uma contínua migração apical do epitélio (epitélio longo de união). Este tipo de epitélio oferece menos resistência aos agentes agressores, o que perpetua o processo

inflamatório (Kaldahl *et al.*, 1996). Este processo culmina com a destruição dos componentes do periodonto (American Academy of Periodontology, 1999).

No caso da Periodontite (Fig. 3), diferentes padrões da doença podem ser detectados. Segundo Hirschfeld e seus colaboradores (1978), os padrões de progressão da periodontite podem ser de três tipos distintos: 1, periodontite «*well maintained*» (caracterizada pelo aparecimento de sinais clínicos da patologia controlável por uma modalidade de tratamento conservador) ; 2. periodontite «*downhill*» (que se caracteriza pela existência de sinais e sintomas, e controlável pela combinação de tratamentos conservadores e mais invasivos. Em alguns casos pode ser detectada alguma evolução e progressão, sendo no entanto limitada) ; 3. periodontite «*extreme downhill*» (apesar das terapêuticas instituídas este padrão apresenta um carácter altamente progressivo podendo culminar com a perda dentária, afectando aproximadamente 5 a 10 % dos doentes).

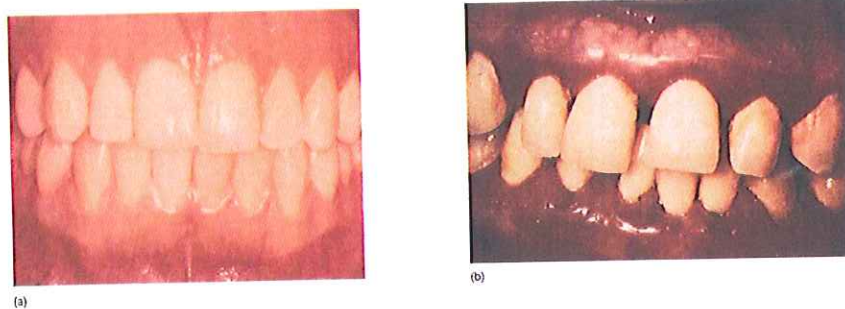


Fig. 3 – Doença periodontal. (a) Gengiva normal. (b) Doença periodontal com inflamação. (Adaptado de: Black, 1999).

A resposta imune de cada indivíduo tem um papel importante no início e progressão desta doença, como foi referido anteriormente, e pode ser influenciada por factores de risco, biológicos e comportamentais (Kornman e Page, 2000). Em presença

de bactérias específicas, o hospedeiro inicia uma resposta de defesa que condiciona o facto de ocorrerem ou não lesões a nível celular e tecidual. Esta resposta pode ser inespecífica (inata), se se tratar do primeiro contacto com os referidos microrganismos, ou específica (adaptativa), quando já ocorreu contacto prévio entre o hospedeiro e os agentes bacterianos (American Academy of Periodontology, 1999).

A presença de bactérias e das suas toxinas estimulam neutrófilos, fibroblastos, células epiteliais e monócitos. Os neutrófilos libertam as metaloproteinases (MPM) que levam à destruição do colagénio. As restantes células envolvidas promovem a libertação de prostaglandinas (Pg), especialmente PgE₂, que por sua vez induzem a libertação de citocinas, entre as quais interleucina 1 (Il1), interleucina 6 (Il6) e factor de necrose tumoral (TNF), que conduzem à reabsorção óssea através da estimulação dos osteoclastos. Estas células, ainda que indirectamente, levam também à lise do colagénio por estimulação das MPM.

Em termos gerais, podemos diferenciar duas entidades distintas da Doença Periodontal dependendo da gravidade da mesma, a Gengivite e a Periodontite (Fig. 4). A primeira é reversível, ao contrário da segunda que é irreversível.



Fig. 4- (a) *Gengivite*: alteração inflamatória, neste caso, restrita aos tecidos gengivais. (Adaptado de: <http://www.lascalajr.com/gengivite.htm>). (b) *Periodontite*. (Adaptado de: http://sergiospagnuolo.com/1676.html?*session*id*key*=*session*id*val*).

Entende-se assim como gengivite uma inflamação resultante da presença de bactérias localizadas na margem gengival, podendo difundir-se por toda a unidade gengival remanescente. A intensidade quer dos sinais quer dos sintomas clínicos podem variar em função dos indivíduos e dos locais numa dentição (American Academy of Periodontology, 1999).

À periodontite corresponde uma lesão inflamatória de carácter infeccioso que envolve os tecidos de suporte dos dentes. Apesar de apresentar as mesmas características clínicas da gengivite, esta ocorre quando as alterações patológicas verificadas na gengivite progridem, observando-se no quadro clínico do paciente uma destruição do ligamento periodontal e migração apical do epitélio de união. Verifica-se deste modo a existência de uma acumulação de placa bacteriana, ao nível dos tecidos mais profundos, causando uma perda de inserção por destruição do tecido conjuntivo e por reabsorção do osso alveolar. Macroscopicamente, a gengiva apresenta-se eritematosa com sinais de inflamação. No entanto, esta característica pode não estar presente, como acontece nos pacientes fumadores nos quais a vasoconstrição provocada pelo tabaco simula ausência de inflamação (American Academy of Periodontology, 1999).

Segundo Tanner, Kent e Maiden (1996), os microrganismos envolvidos na saúde periodontal eram predominantemente bactérias de Gram positivo, dos Géneros *Streptococcus* e *Actinomyces* (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii* e *Actinomyces naeslundii*). Algumas espécies bacterianas encontradas como o *Streptococcus sanguis*, a *Veillonella parvula* e a *Capnocytophaga ochracea* foram propostas como sendo protectoras ou benéficas para o hospedeiro, pelo facto de inibirem o crescimento de bactérias periodontopatogénicas como o *Actinobacillus actinomycescomitans* (Socransky e Haffajee, 1992).

A placa bacteriana apresenta bactérias Gram positivo (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii* e *Peptostreptococcus micros*) e as Gram negativo *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Haemophilus* e *Campylobacter spp* (Socransky e Haffajee, 1992).

Segundo Tanner, Kent e Maiden (1996), as espécies bacterianas associadas à periodontite são: *Actinomyces georgiae*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces IG*, *Veillonella parvula*, *Capnocytophaga ochracea*, *Selenomonas noxia* e *Prevotella nigrescens*. Verificou-se, em indivíduos portadores de gengivite, quantidades reduzidas de *Actinobacillus actinomycescomitans*, presença de *Capnocytophaga gingivalis* e *Eikenella corrodens* e um forte aumento de *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, e *Wolinella recta*. Em alguns quadros de gengivite foram ainda observadas a presença de *Streptococcus anginosus*, *Campylobacter concisus*, *Treponema socranskii subsp. paredis*, *Actinobacillus naeslundii III*, e *Streptococcus sanguis I* (Kolenbrander *et al.*, 1994).

Em quadros clínicos de indivíduos portadores de periodontite foi observada a presença comum de espécies bacterianas como *Porphyromonas gingivalis*, *Eubacterium*

nodatum, *Eubacterium timidum*, *Eubacterium brachy* e *Peptostreptococcus anaerobius* (Moore e Moore, 1994). Nas bolsas periodontais, a localização ou distribuição dos microrganismos patogénicos pode estar relacionada com a destruição periodontal. Noiri *et al.* (2001) descreveram a presença de bactérias do tipo *Prevotella nigrescens* na fracção média das bolsas periodontais (tecido epitelial), presença de *Fusobacterium nucleatum* e *Treponema denticola* (em superfícies da placa dentária não aderida), *Eikenella corrodens* (relacionada com a zona de placa aderida) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, na porção apical da bolsa.

A microbiota preponderante na porção apical da bolsa periodontal (25,1% de bactérias Gram positivo) difere da microbiota encontrada no sulco gengival saudável (85% de bactérias de Gram positivo). Quanto à presença de bactérias anaeróbias estão descritas, respectivamente, 89,5% e 24,3% das bactérias isoladas.

De todos os bacilos Gram positivo anaeróbios isolados, 78,4% encontram-se localizados nas bolsas profundas e 19,9% no sulco saudável. Pode assim inferir-se que a inflamação gengival iniciada pela placa supragengival pode produzir condições favoráveis a colonização de bactérias Gram negativo (Slots, 1977).

As bolsas periodontais profundas não são por si só pré-requisitos para o desenvolvimento de *Porphyromonas gingivalis*, uma vez que a sua ocorrência é elevada em indivíduos sem doença periodontal (Dahlén *et al.*, 1992). Percentagens mais elevadas de *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e espécies de *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* e *Treponema* são tão prevalentes tanto em amostras supra como subgengivais, em indivíduos com periodontite (Ximenes-Fyvie *et al.*, 2000).

Em pacientes com periodontite, foram avaliadas as proporções de indivíduos que apresentaram resultados positivos para *Porphyromonas gingivalis* (93,5%), *Prevotella intermédia* (91,6%), *Bacteroides forsythus* (98,0%), e *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* (81,4%) (Rubira *et al.*, 1996). A *Prevotella intermedia* foi indicada como o principal patogénico para o desenvolvimento de doenças periodontais (Raber *et al.*, 1994).

Em 1988, Socransky *et al.* evidenciaram que a doença periodontal destrutiva pode depender da compatibilidade da natureza do hospedeiro ou de espécies bacterianas benéficas que favoreçam a colonização de outras espécies. O *Streptococcus sanguis*, o *Streptococcus uberis* e *Actinomyces viscosus* inibem o crescimento *in vitro* do *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* e o mecanismo sugerido para esta inibição, parece ser a formação de peróxido de hidrogénio.

Schlegel-Bregenzler *et al.* (1998) mediante os seus estudos conducentes à avaliação da microbiota supra e subgingival, através de metodologias microbiológicas clássicas e através de sondas de DNA, verificaram que a placa supragengival de indivíduos com gengivite e periodontite apresentava *Prevotella nigrescens*, *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas gingivalis*. Pelo método cultural, a placa subgingival apresentava *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*. Pelo método da sonda de DNA foram evidenciados elevadas percentagens de *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Treponema denticola*, tanto na placa supragengival quanto na placa subgingival, de indivíduos com gengivite e periodontite. Comparando a microbiota subgingival de indivíduos saudáveis, com gengivite e com periodontite inicial observou-se que pelo método de cultura *Bacteroides forsythus*, *Campylobacter rectus*, *Selenomonas noxia*, *Actinomyces naeslundii* e *Streptococcus oralis* foram espécies predominantes associadas à periodontite. *Actinomyces naeslundii*, *Campylobacter gracilis* e *Bacteroides forsythus* (em menores níveis que na periodontite) foram predominantes na gengivite. Espécies associadas com saúde, *Streptococcus oralis* e *Actinomyces naeslundii* e *Actinomyces gerencseriae*. A sonda de

DNA identificou médias mais altas de *Bacteroides forsythus* e *Campylobacter rectus* na periodontite. *Porphyromonas gingivalis* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* foram detectados menos frequentemente, nos indivíduos estudados (Tanner *et al.*, 1998).

Segundo alguns autores o *Fusobacterium nucleatum* é a espécie mais frequentemente isolada a partir da cavidade oral. Caracteristicamente, é um bacilo de Gram negativo anaeróbio, não formador de esporos e imóvel (Bolstad *et al.*, 1996). A heterogeneidade encontrada no *F. nucleatum* é evidente, sendo conhecidas cinco subespécies desta estirpe: *F. nucleatum* subespécie *nucleatum*, *F. nucleatum* subespécie *vincentii*, *F. nucleatum* subespécie *polymorphum*, *F. nucleatum* subespécie *fusiforme* e *F. nucleatum* subespécie *animalis* (Dzink *et al.*, 1990, Gharbia e Shah, 1992 e Jousimies-Somer, 1997).

Esta bactéria actua como uma ponte entre os primeiros e os últimos colonizadores da placa dentária e pode coagregar-se com muitas espécies encontradas na cavidade bucal, incluindo os patogénicos periodontais (Kolenbrander *et al.*, 1989, Kinder *et al.*, 1986, Takemoto *et al.*, 1995 e Bradshaw *et al.*, 1989). A proporção e número de isolados de *F. nucleatum* apresenta-se mais relevante em indivíduos com tecidos periodontais comprometidos. Durante as infecções periodontais, *F. nucleatum* torna-se uma das espécies anaeróbias mais abundantes (Moore e Moore, 1994). No entanto, o papel patogénico de *F. nucleatum* na doença periodontal é provavelmente mascarado uma vez que também é uma bactéria passível de ser isolada de indivíduos saudáveis (Ximenez-Fyvie, 2000). Para além disso, os factores de virulência que lhe estão associados são menos estudados do que os de outras bactérias conhecidas como factores etiológicos em doenças periodontais (Bolstad *et al.*, 1996, Kononen *et al.*, 2003).

As estirpes de *F. nucleatum* revelaram resistência à eritromicina (Walker *et al.*, 1979). Todavia, apesar da maioria das estirpes revelar sensibilidade às penicilinas,

foram já reportados alguns isolados resistentes, produtores de β -lactamases (Richard *et al*, 2006, Nyfors *et al*, 1999 e 2003 e Tuner *et al*, 1985).

Na Fig. 5 abaixo estão indicados os perfis de colonização bacteriana nos dentes saudáveis e nos dentes de doença periodontal.

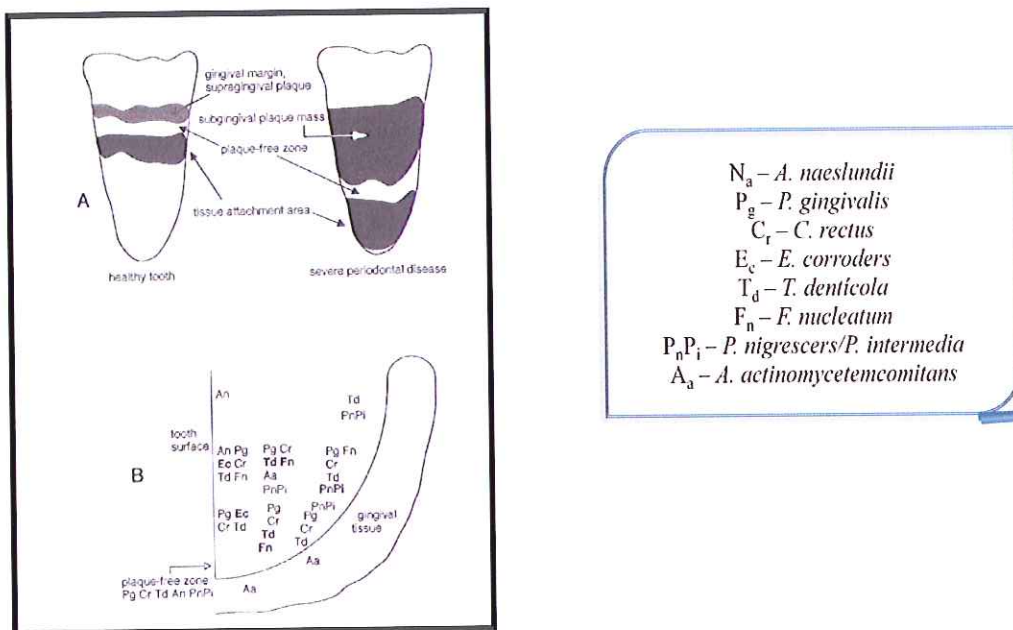


Fig. 5- Perfis de colonização bacteriana em dentes saudáveis e na doença periodontal. (Adaptado de: Ghannoum e O'Toole, 2004).

A suspeita de associação entre algumas patologias sistêmicas e patologias da cavidade oral é antiga. Neste contexto, na Tabela 1 as possíveis relações entre a Doença Periodontal e as várias Patologias Sistêmicas que a ela têm vindo a ser associadas, como sejam a Diabetes *Mellitus*, as Doenças Cardiovasculares, as Infecções Respiratórias, a Artrite Reumatóide e a ocorrência de Partos Prematuros.

Tabela1: Associação entre a doença Periodontal e algumas Patologias Sistémicas.

Doença	Agentes Etiológicos envolvidos	Observações / Outros factores envolvidos	Referências Bibliográfica
DIABETES MELLITUS	Sem especificação	Parece existir uma possibilidade do tratamento periodontal em pacientes diabéticos, resultar numa melhoria do controlo metabólico	Faria-Almeida <i>et al</i> , 2006
DOENÇAS CARDIOVASCULARES	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Tannerella forsythensis</i> <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	Pode estar associada ao aumento dos níveis de marcadores pró-inflamatórios: Proteína C-Reactiva, IL-6, fibrinogénio e leucócitos	Haraszthy <i>et al</i> , 2000; Leivadaros <i>et al</i> , 2005 e Seymour <i>et al</i> , 2003).
INFECCÕES RESPIRATÓRIAS	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Acção de enzimas associadas à Doença Periodontal que promovem a adesão e a colonização de bactérias, passíveis de causar doenças respiratórias	Terpenning <i>et al</i> , 2001
ARTRITE REUMATÓIDE	Sem especificação	Avaliação de mediadores inflamatórios: factores reumatóides, prostaglandinas, ICTP (<i>type 1 carboxy terminal peptide</i>) e proteína C reactiva, possibilita apreciação de ambas as patologias	Hirschfeld <i>et al</i> , 1978)
PARTOS PREMATUROS	Bactérias predominantemente anaeróbias e de Gram negativo	Síntese de PGE2 e TNF-a pelas células corio-amnióticas induzidas pelos lipopolissacarídeos (LPS) oriundos da infecção periodontal, disseminados pela corrente sanguínea	Offenbacher <i>et al</i> , 1998

IV. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DAS PERIODONTITES

Um dos mais importantes avanços no campo da microbiologia associada à doença periodontal é o conceito de especificidade, o qual atribui a cada entidade clínica um grupo específico de patogénicos (Newman e Nisengard, 1994). Para alguns microrganismos, tais como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* e *Porphyromonas gingivalis* as evidências são amplas quanto a sua especificidade e por isso considerados agentes etiológicos das periodontites (Zambon, 1996). Baseados nas evidências que implicam certas espécies microbianas como patogénicos periodontais têm sido usados vários ensaios laboratoriais para a detecção e a quantificação relativa das bactérias presentes nas amostras das placas bacterianas dos pacientes (Zambon e Haraszthy, 1995).

Quando utilizados correctamente, os testes de diagnóstico microbiológico podem ser decisivos para identificar quais os factores de risco para a doença, avaliar a severidade da doença, efectuar um prognóstico e seleccionar os fármacos antimicrobianos a administrar. Assim, um ensaio ideal para o uso clínico deveria ser rápido, simples e de custo relativamente baixo (Nisengard *et al*, 1992).

Acresce que poucos são os estudos detalhados que referem o cultivo e isolamento laboratorial destes microrganismos, uma vez que estes apresentam um crescimento lento e de difícil tecnologia.

Várias tecnologias laboratoriais contribuem para o diagnóstico laboratorial, nomeadamente:

i. MICROSCOPIA DE CAMPO ESCURO E CONTRASTE DE FASE

O exame microscópico das amostras permite a detecção da forma, tamanho e mobilidade dos microrganismos sem diferenciá-los ao nível da espécie. A microscopia de campo escuro e a de contraste de fase determinam a percentagem relativa de microrganismos presentes e têm a capacidade de avaliar as bactérias móveis, no entanto, como a maioria dos patogénicos da doença periodontal são bastonetes imóveis, tais técnicas apresentam um uso limitado (Carranza e Newman, 1997).

ii. EXAMES CULTURAIS EM AEROBIOSE E ANAEROBIOSE

Nesta técnica, as amostras da placa bacteriana devem ser obtidas das bolsas periodontais do paciente, homogeneizadas e semeadas em vários tipos de meios de cultura e incubadas em condições de aerobiose e anaerobiose (85% de nitrogénio, 10% de hidrogénio e 5% de gás carbónico) (Fig. 6). Após um período de incubação adequado, as placas são examinadas e as colónias isoladas subcultivadas em meios de cultura diferenciais para a identificação das espécies e para a realização dos testes de susceptibilidade aos antibióticos (American Academy of Periodontology, 1994). Todavia, esta técnica apresenta-se bastante dispendiosa e morosa, sendo necessário pessoal com formação especializada para a sua execução (Listgarten, 1983). Advêm ainda como factores limitantes associados, a dificuldade de crescimento de algumas bactérias em meio de cultura devido às suas exigências nutricionais, a perda de viabilidade dos microrganismos durante o transporte e a sua cultura e identificação apenas ao nível da espécie (Zambon, 1995).



Fig. 6 – Panela *Gaspak* com ambiente anaeróbico para o crescimento bacteriano.

iii. ENSAIO ENZIMÁTICO – BANA

Técnica rápida e pouco dispendiosa que detecta grupos bacterianos da placa bacteriana, através dos perfis enzimáticos dos microrganismos da placa bacteriana. Segundo Loesche *et al*, (1990) , *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* e *Treponema denticola* apresentam em comum uma enzima semelhante à tripsina (*trypsin-like*) cuja actividade pode ser avaliada pela hidrólise do substrato N-Benzoil-dL-Arginina-2-Naftilamina (BANA). Assim, com a utilização deste teste podemos confirmar a presença de uma ou mais espécies bacterianas acima descritas.

iv. MARCADORES BIOQUÍMICOS

As alterações que ocorrem nos tecidos periodontais com lesão podem ser detectadas bioquimicamente, antes do diagnóstico clínico das lesões (American Academy of Periodontology, 1994). Assim a detecção de factores derivados do hospedeiro podem auxiliar na identificação de locais periodontais com risco de progressão futura; nomeadamente os componentes existentes no sulco gengival, como as enzimas libertadas pelo hospedeiro (colagenase, elastase e glucoronidase) e os mediadores químicos de inflamação (interleucinas - IL1, IL6 e IL8 e o factor de necrose tumoral -TNF) (Meyer *et al*, 1994).

v. TÉCNICAS IMUNOLÓGICAS

Incluem reacções onde se utilizam anticorpos policlonais ou monoclonais específicos para antígenos bacterianos ou para factores de virulência dos microrganismos. São vantajosos na identificação de microrganismos presentes em amostras da placa bacteriana subgengival dos pacientes que apresentam quadro de periodontite (Genco *et al*, 1997). Nesta categoria enquadram-se as técnicas de imunofluorescência, ELISA, aglutinação e citometria de fluxo.

Nas técnicas de imunofluorescência utilizam-se anticorpos específicos marcados para determinados patógenos periodontais. A reacção dos anticorpos com os antígenos bacterianos pode ser detectada pela marcação directa do anticorpo com uma substância fluorescente (Imunofluorescência directa) ou através da utilização de um segundo anticorpo marcado (Imunofluorescência indirecta) (Listgarten, 1994). A imunofluorescência associa a sensibilidade e a especificidade de um ensaio imunológico

com a visualização ao microscópio de fluorescência permitindo assim a identificação de certos microrganismos presentes na placa bacteriana (Nisengard e Newman, 1994).

A falta de especificidade do teste é grande, pois podem ocorrer reacções cruzadas com outros microrganismos que habitam o interior das bolsas periodontais.

Na técnica ELISA detecta antígenos ou anticorpos e permite a aplicação de técnicas directas e indirectas. Esta reacção é sensível, relativamente económica e tem sido desenvolvida para utilização directa em consultórios odontológicos (Nisengard e Newman, 1994). As amostras do paciente são incubadas em recipientes específicos para que haja a formação de complexos antígeno-anticorpo. A adição do anti-soro conjugado a uma enzima catalisa a reacção colorimétrica que permite a detecção do primeiro anticorpo (Listgarten, *et al*, 1983) e a sua quantificação.

Nas técnicas de aglutinação usam-se microesferas de látex cobertas com anticorpos específicos para determinados patogénicos periodontais. Existem dois tipos de teste: a técnica directa e a inibição de aglutinação. A técnica directa é a mais vulgarmente aplicada, na qual ocorre aglutinação, que equivale a um resultado positivo, aquando do contacto das microesferas cobertas com anticorpos com os antígenos bacterianos. Em contrapartida, o teste de inibição da aglutinação exhibe como resultado positivo a não aglutinação aquando do contacto entre antígeno e anticorpo. Dada à sua fácil realização e rapidez na obtenção dos resultados, estes testes exibem um grande potencial para o uso rotineiro na detecção de patogénicos periodontais (Carranza e Newman, 1997).

A Citometria de Fluxo também tem sido aplicada na identificação de microrganismos orais. O procedimento envolve a reacção de bactérias da placa com

anticorpos específicos marcados com fluoresceína. Utiliza-se um citómetro de fluxo, o qual incide raios laser na suspensão obtida pela placa bacteriana e anticorpos específicos para as bactérias da placa. As células dispersam a luz em diferentes ângulos que são medidos por detectores apropriados. Como cada tipo de célula possui um padrão e um volume de reflexão característicos, pode-se assim identificar os microrganismos desejados (American Academy of Periodontology, 1994, Nisengard e Newman, 1994 e Genco *et al*, 1997).

vi. ANÁLISE DE DNA E RNA

Estas técnicas baseiam-se na capacidade de hibridação de fragmentos de DNA com sequências complementares de outros DNA ou RNA. Devido à alta sensibilidade e especificidade, estas técnicas são importantes na detecção de patogénicos de difícil cultivo, microrganismos que compõem uma microbiota mista ou ainda aqueles presentes em número reduzido (Carranza e Newman, 1997).

A) SONDAS DE DNA

Sondas são fragmentos de DNA seleccionados que contém sequências nucleotídicas específicas e usadas para detectar a presença de uma sequência de DNA complementar numa dada amostra (Melvin *et al*, 1994). As sondas de RNA ribossómico são utilizadas para estudar as regiões de hipervariabilidade de RNA 16S, características de cada uma das diferentes espécies bacterianas da placa dentária (Loesche, 1992). A visualização da sonda é possível pela sua marcação com elementos radioactivos, fluorescentes ou enzimáticos (Fig. 8). O DNA obtido a partir da amostra colhida do sulco gengival é desnaturado em cadeia simples e então combinado com as sondas

marcadas, obtidas a partir de um microrganismo conhecido. A hibridação das sondas, com o DNA das amostras colhidas permite a identificação dos agentes etiológicos da infecção. A intensidade da reacção aumenta proporcionalmente ao número de microrganismos, presentes, permitindo assim sua quantificação na amostra (Melvin *et al*, 1994).

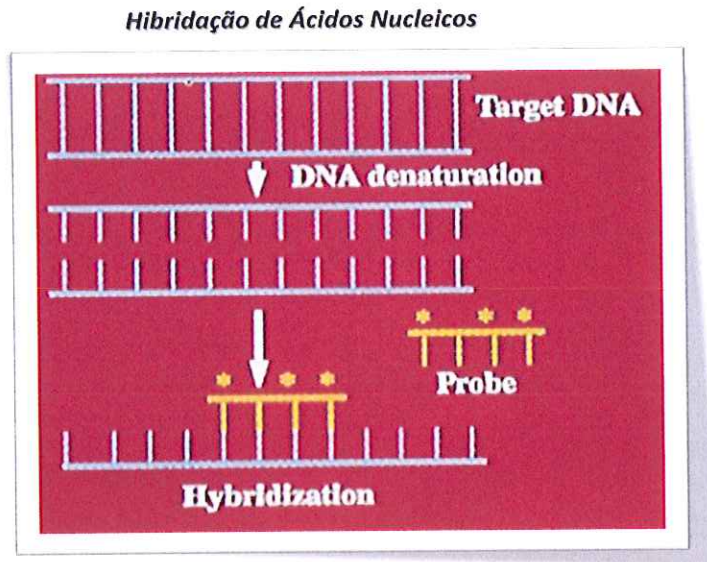


Fig. 7 – Hibridação de DNA alvo com sondas marcadas de DNA.

B) *POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR)*

O mais sensível de todos os testes microbiológicos, capaz de detectar um único microrganismo, baseia-se na análise de ácidos nucleicos. Um segmento de DNA alvo delimitado por dois primers oligonucleotídicos é amplificado por uma DNA polimerase termo-estável. A amplificação do DNA ocorre *in vitro* por ampliações em ciclos sucessivos. Cada ciclo envolve a desnaturação do DNA alvo, a sua hibridização com *primers* complementar do DNA alvo e a síntese das sequências compreendidas entre os dois *primers*, com a intervenção da taq polimerase (Fig. 8). Ao fim de 30 ciclos

sucessivos originam-se milhões de moléculas do DNA alvo, o que pode ser caracterizado por electroforese em gel de agarose (Zambon e Haraszthy, 1995).

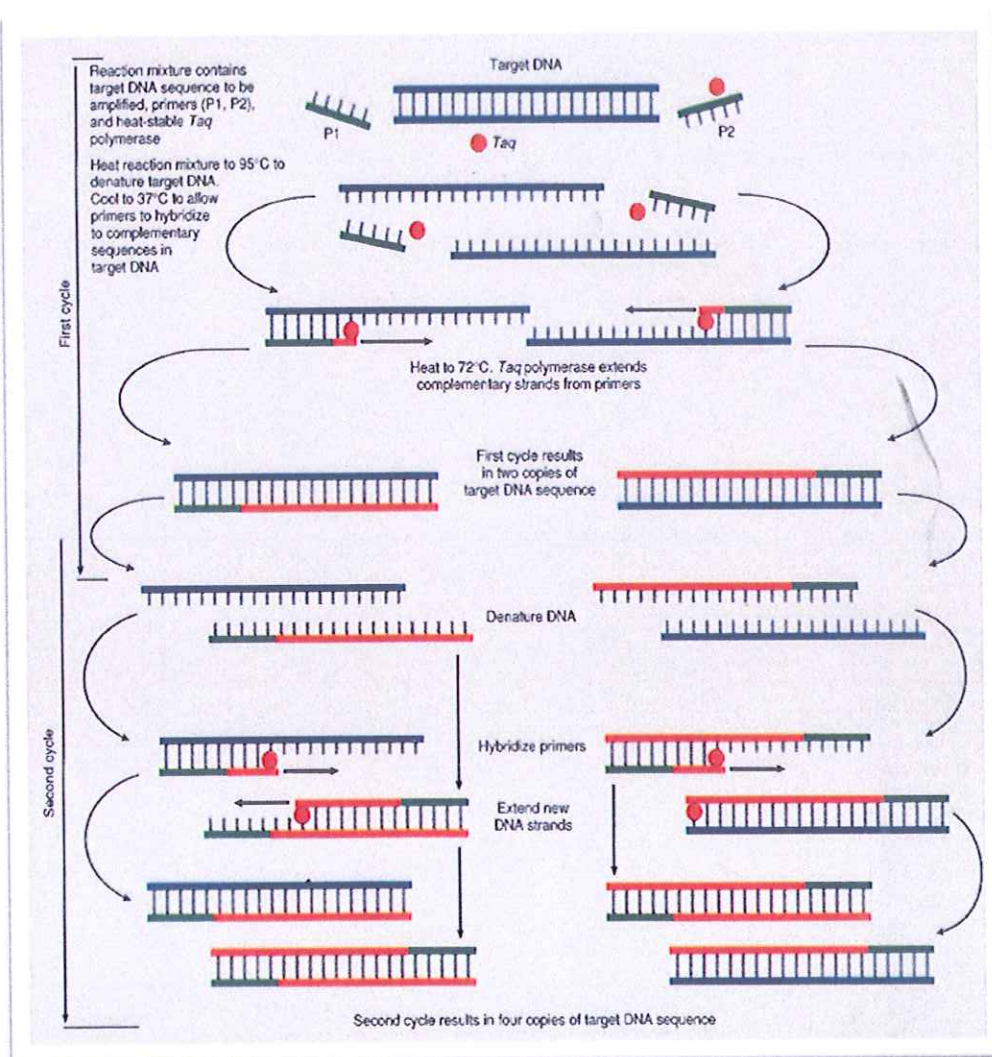


Fig. 8 – Esquema da reacção de amplificação de DNA por PCR.

C) SEQUENCIAÇÃO DO GENE 16 S rRNA

Após amplificação do gene 16S rRNA a partir das amostras primárias, ou a partir das colónias bacterianas obtidas pelos métodos culturais tradicionais, a sequenciação do gene 16S rRNA permite a identificação das estirpes bacterianas (Zucol *et al.*, 2006).

Sendo universal, o gene 16S rRNA permite estabelecer relações entre todas as bactérias. A sequenciação de primers de 500pb deste gene permite diferenciar espécies, só sendo requerida a sequência dos 1500pb do gene 16S rRNA quando for necessário diferenciar espécies filogeneticamente próximas (Clarridge, 2004).

Este método parece ser mais indicado para o diagnóstico microbiano da cavidade oral, tornando possível a identificação de novos agentes microbianos.

D) SUSCEPTIBILIDADE DOS AGENTES ETIOLÓGICOS DAS PERIODONTITES AOS ANTIBIÓTICOS

Uma vez isolado o agente etiológico das periodontites é possível realizar os testes de susceptibilidade dessas estirpes aos diversos antibióticos, *in vitro*, o que vulgarmente se designa por antibiograma. Estes testes podem ser realizados por métodos de difusão, usando discos de papel impregnados com diversos antibióticos ou usando o E-teste que permite calcular o CMI ($\mu\text{g/ml}$) (Fig.9).

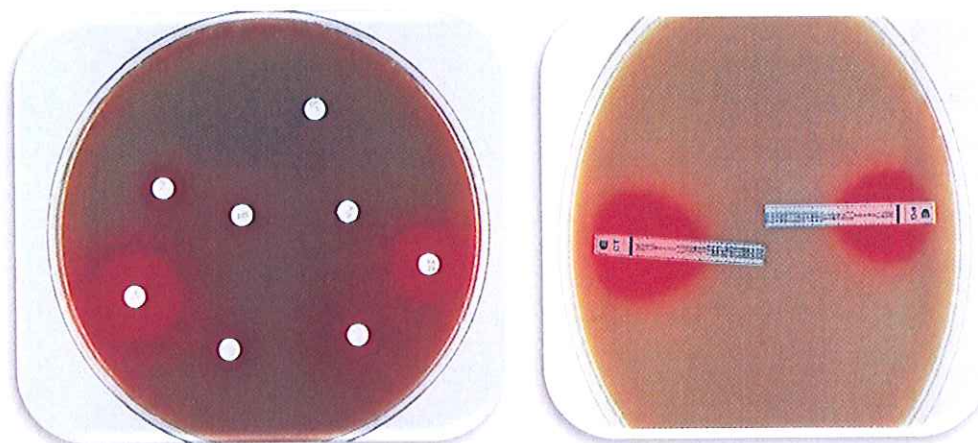


Fig. 9 – Exemplo de testes para o antibiograma (métodos dos discos de papel à esquerda e o C-teste à direita).

Após a realização do antibiograma o médico dentista deve prescrever um antibiótico eficaz, com poucos efeitos secundários e baratos. A opção terapêutica poderá estar também condicionada quando os doentes co-administram outros fármacos.

Torna-se assim importante conhecer as características dos principais grupos de antibióticos a usar em medicina oral.

V. ANTIBIÓTICOS E ANTIMICROBIANOS

Inicialmente, a denominação de antibiótico era usada para descrever uma substância, produzida ou derivada principalmente a partir de alguns fungos, bactérias e outros organismos, que poderiam destruir ou inibir diretamente o crescimento de outros microrganismos. Mais tarde, esta designação apresenta um conceito mais abrangente, incluindo substâncias sintéticas ou semi-sintéticas.

O primeiro antibiótico, a penicilina, foi descoberto em 1928 por Sir Alexander Fleming, a partir de culturas de *Penicillium notatum*. (Fig.10)

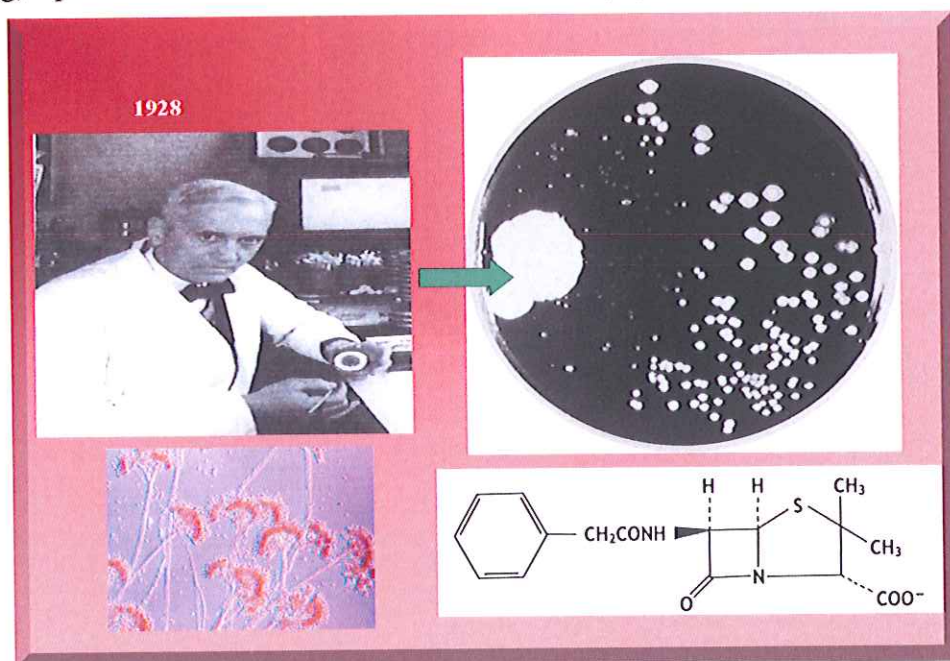


Fig.10- Em 1928, *A.Fleming* descobre o fungo *Penicillium notatum* produtor de penicilina.

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização no tratamento de doenças infecciosas constitui um dos maiores avanços da medicina no século XX. Contudo, com a utilização exercida em larga escala pela antibioterapia promoveu-se o aumento da

pressão selectiva e, conseqüentemente, a incidência de estirpes resistentes (Sousa, 2006).

Os agentes antimicrobianos podem ser divididos em dois grupos: agentes bactericidas, os que eliminam bactérias; e agentes bacteriostáticos, que inibem a multiplicação bacteriana sem eliminá-las. Verifica-se que estes agentes inibem o crescimento ou erradicam microrganismos através de variadíssimos mecanismos. De uma forma geral, o seu mecanismo de acção contra bactérias envolve a parede celular, os ribossomas, a membrana citoplasmática e replicação de ácidos nucleicos.

i. ANTIBIÓTICOS NA PRÁTICA ODONTOLÓGICA: CONSIDERAÇÕES GERAIS

Como referido anteriormente, a periodontite e a gengivite são doenças dentárias mediadas por biofilmes (Pennisi, 2005 e Sbordone e Bortolaia, 2003). A remoção mecânica do biofilme dentário, normalmente, é por si só, mas nem sempre, suficiente para o controle destas doenças. Assim, a aplicação quimioterápica pode por vezes complementar a acção mecânica.

Aos profissionais de medicina dentária, por lei, é-lhes concedido o direito de prescrever uma bateria de antibióticos na prática odontológica. Em geral, a prescrição antimicrobiana é justificada por: (1) ajuda terapêutica num tratamento cirúrgico provocado por uma infecção aguda ou crónica, (2) terapêutica para o tratamento de doenças infecciosas activas, por exemplo, gengivite ulcerativa aguda, e (3) profilaxia de

prevenção de infecções metastáticas, como a endocardite bacteriana (Longman e Martin, 1999 e Tong e Rothwell, 2000).

A terapia simples ou combinada adquiriram uma importância crescente na prática odontológica, contudo, sempre que possível, um único fármaco deve ser prescrito de forma a reduzir a incidência de efeitos colaterais e os custos da terapêutica. A prescrição de antibióticos deve ser baseada em testes microbiológicos para algumas doenças clinicamente diagnosticadas: periodontite agressiva, periodontite crónica grave, periodontite manifestando uma progressiva perda de controlo apesar do tratamento adequado, e periodontite severa associada a doenças sistémicas, como por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana (Krigar *et al*, 2007).

Dados bibliográficos demonstram que são utilizadas várias classes de agentes antimicrobianos (Slots e Ting, 2000, Epstein e Chong, 2000). No que respeita à terapêutica empírica, devem ser consideradas as características farmacológicas do fármaco, a segurança para o paciente, o agente infeccioso provável, e do custo do medicamento. No entanto, a atitude parece ser tendenciosa em direcção a determinadas classes de antimicrobianos, principalmente para as penicilinas e o metronidazol (Epstein e Chong, 2000 e Palmer *et al*, 2000).

A maioria das infecções orais existentes são polimicrobianas devido ao envolvimento de bactérias Gram positivo e Gram negativo, tanto anaeróbias como aeróbias. Focar-se-á de seguida, uma descrição dos fármacos mais prescritos na prática odontológica.

a) AGENTES β -LACTÂMICOS

A produção em massa desta classe de agentes antimicrobianos iniciou-se em 1939, quando foi efectuado um esforço conjunto pela Grã-Bretanha, Canadá e Estados Unidos para produção em massa de penicilina para o exército. Quatro tipos moleculares de β -lactâmicos são utilizados na clínica: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenemos (Fig.11).

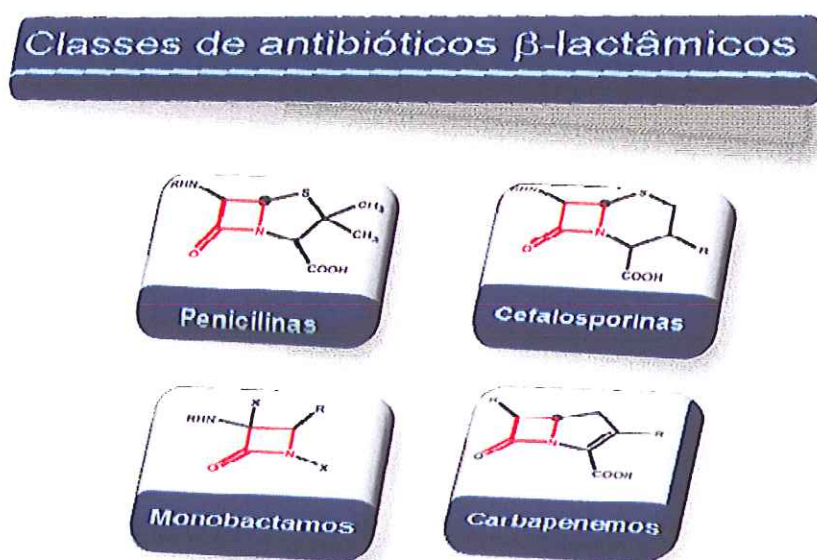


Fig.11- As quatro classes antibióticos β -lactâmicos.

As penicilinas são os agentes antimicrobianos mais amplamente utilizados em medicina dentária, sobretudo as de absorção oral, nomeadamente as aminopenicilinas (Sousa, 2006).

Os β -lactâmicos são antibióticos anti-parietais, inibidores da biossíntese do peptidoglicano. A interação entre o antibiótico e o seu alvo PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*) requer a integridade do anel β -lactâmico da molécula (Fig. 12) o que não é possível quando as bactérias são produtoras de β -lactamases (Fig.13) (Sousa, 2006).

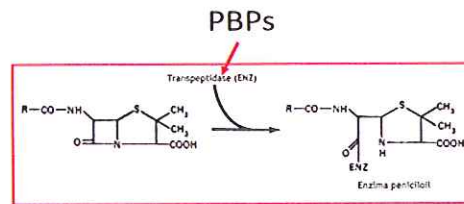
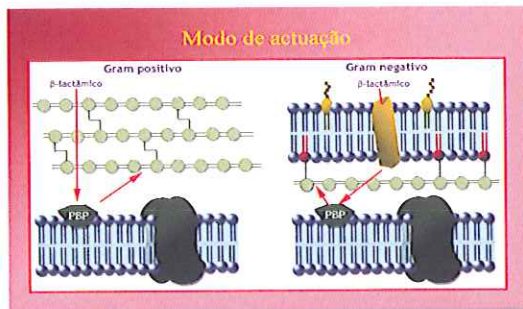


Fig.12- Mecanismo de acção dos β -lactâmicos.

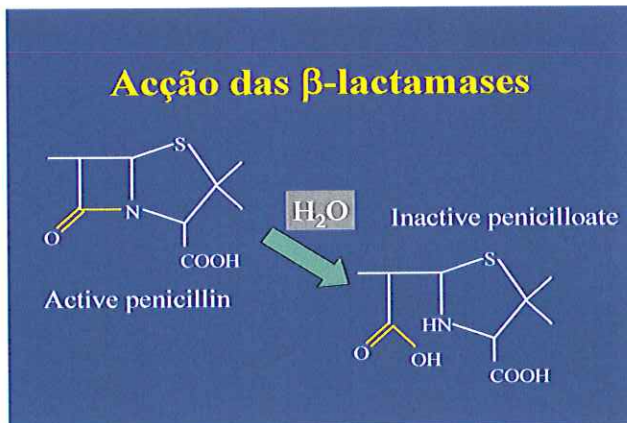


Fig. 13- Inactivação dos β -lactâmicos por β -lactamases.

A maioria dos anaeróbios estritos da cavidade oral são produtores de β -lactamases, pelo que é de aconselhar a utilização de aminopenicilinas associadas a inibidores das β -lactamases (como o ácido clavulânico) (Fig.14) (Sousa, 2006).

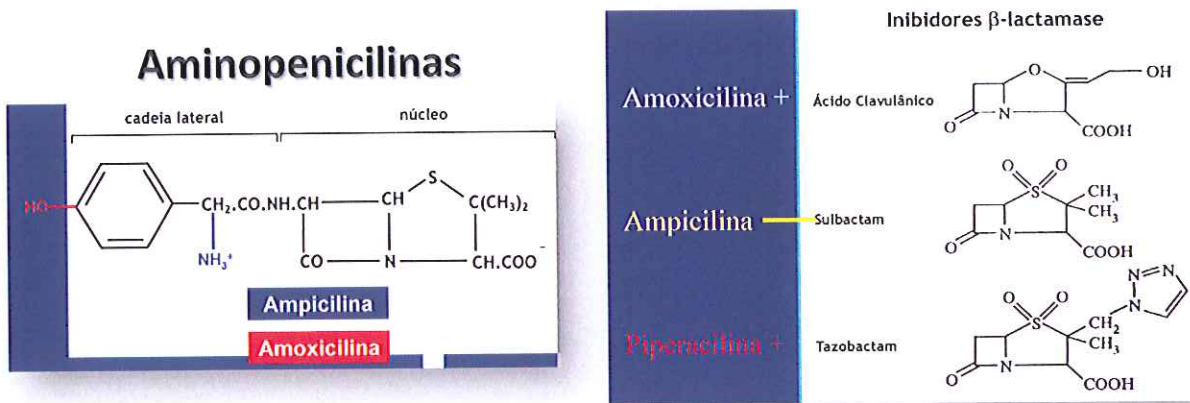


Fig.14- As aminopenicilinas associadas a inibidores das β-lactamases recuperam a sua actividade contra bactérias produtoras de β-lactamases.

A amoxicilina é o antibiótico mais largamente utilizado, geralmente associado ao ácido clavulânico. Apresenta uma boa absorção oral, atingindo-se elevados níveis séricos do antibiótico (Fig.15). É também frequentemente utilizado na profilaxia da endocardite bacteriana (Sousa, 2006).

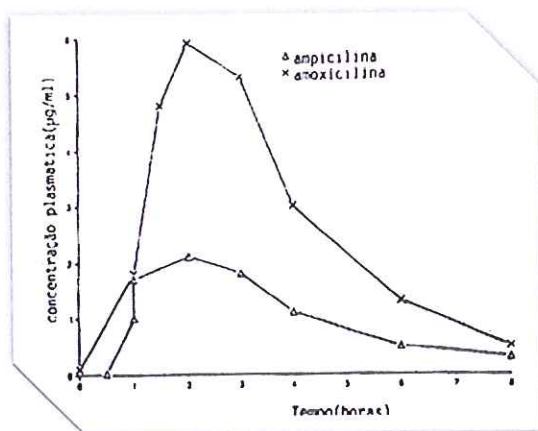


Fig.15 – Melhor absorção oral de amoxicilina versus ampicilina.

Nos doentes alérgicos à penicilina ter-se-á de recorrer a outros grupos de antimicrobianos, nomeadamente tetraciclina, macrólidos, lincosamidas e metronidazol (Sousa, 2006).

b) METRONIDAZOL (Fig.16)

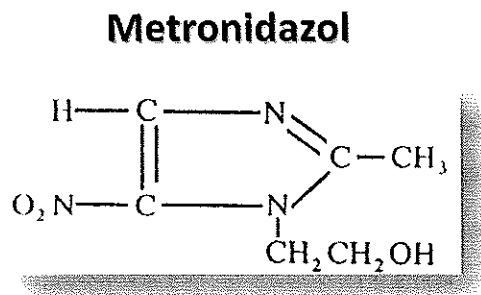


Fig.16- Estrutura química de metronidazol.

O metronidazol foi introduzido em meados dos anos 1950 e era inicialmente usado no tratamento da tricomoníase, tendo-se verificado mais tarde a sua actividade antibacteriana. É um potente inibidor de microrganismos com um metabolismo anaeróbio. Este composto reduzido interacciona com o DNA, destabilizando o seu enrolamento e provocando consequentemente a morte celular (Sousa, 2006).

O fármaco, frequentemente em associação com penicilinas, é indicado para o tratamento da gengivite ulcerativa necrosante aguda e de infecções odontológicas que variam entre moderadas a severas (Richard *et al*, 2006 e Samaranayake, 2006).

Apresenta o inconveniente da sua administração ser incompatível com o álcool, provocando o efeito dissulfiram. Estudos revelam também que o seu uso juntamente com outros fármacos neurotóxicos pode aumentar a sua toxicidade (Sousa, 2006).

c) TETRACICLINAS (Fig. 17)

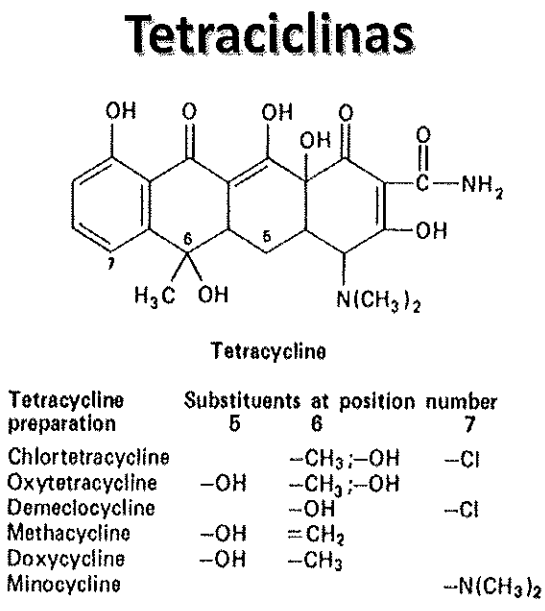


Fig.17- Estrutura química das tetraciclinas.

As tetraciclina são fármacos bacteriostáticos, de largo espectro, e que se ligam a subunidade ribossomal 30S, inibindo especificamente a ligação das sintetases do aminoacil-RNA_t aos locais de ligação ribossómicos, impedindo assim a síntese proteica (Samaranayake, 2006).

A tetraciclina, a doxiciclina e a minociclina são os membros desta família de antibióticos mais conhecidos. Em odontologia, as tetraciclina são usadas com algum sucesso como coadjuvantes no tratamento periodontite aguda (Samaranayake, 2006).

As tetraciclina quelatam Ca⁺⁺ e Mg⁺⁺, o que vai condicionar a sua actividade antibacteriana, depositando-se no tecido calcificado, ou quando são co-administradas com medicamentos contendo estes iões (como são exemplo os anti-ácidos) ou com o leite. (Sousa, 2006)

Para além da actividade antibacteriana, estes fármacos apresentam também propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, imunossupressoras, supressão da produção de anticorpos nos linfócitos, redução da função fagocítica em leucócitos polimorfonucleares e redução da quimiotaxia de leucócitos e neutrófilos. São ainda activos como inibidores da actividade da lipase e da colagenase (Roberts, 2002, Golub *et al.*, 1998 e Ryan e Ashley, 1998).

Dos principais inconvenientes apontados para as tetraciclinas destacam-se a intolerância gástrica, hipersensibilidade, fototoxicidade (Fig.18), nefrotoxicidade, efeitos hematológicos, reações hepáticas, efeitos no sistema nervoso central e efeitos locais como o seu depósito no esmalte dos dentes devido ao seu tropismo para os íons cálcio (Sousa, 2006).

Crianças ou mulheres Grávidas



Fototoxicidade



Fig.18- Efeitos fototóxicos das tetraciclinas.

d) MACRÓLIDOS E LINCOSAMIDAS (Fig.19)

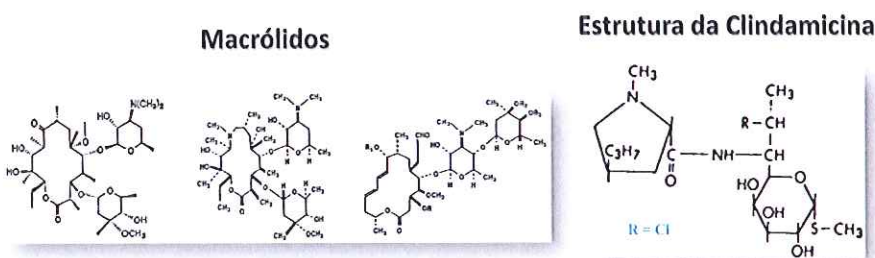


Fig. 19 – Estrutura química dos macrólidos e lincosamidas.

Os macrólidos, lincosamidas e estreptograminas de classe B (MLS) são fármacos estruturalmente diferentes mas funcionalmente semelhantes. Apresentam efeito bacteriostático exercendo a sua acção por interferirem com a síntese proteica (pela sua ligação à subunidade ribossomal 50S) (Roberts, 2002).

São membros da família dos macrólidos a eritromicina, a claritromicina, a azitromicina e a espiramicina (Rovamicina[®]). Os macrólidos apresentam actividade contra estreptococos, estafilococos, e alguns anaeróbios orais (Richard *et al*, 2006).

A clindamicina é uma lincosamida e é eficaz contra espécies de bactérias aeróbias e anaeróbias. Trata-se de um antibiótico bacteriostático eficaz que exerce a sua acção por interferir com a síntese proteica (Addy e Martin, 1998), no entanto a sua administração oral pode ocasionar a colite pseudo-membranar (*C. difficile*).

Os macrólidos e as lincosamidas são de metabolização hepática e são reconhecidos como inibidores do citocromo P₄₅₀, o que dificulta a sua co-administração com outros fármacos de metabolização hepática, como a varfarina, a sinvastatina, entre outros (Sousa, 2006). Apresenta-se de seguida uma tabela resumo (**Tabela 2**) relativa aos principais agentes antimicrobianos utilizados em medicina oral, espectros de inibição, mecanismos de acção e de resistência, que *a posteriori* serão detalhados.

Tabela 2: Síntese dos mecanismos de acção, espectro antimicrobiano e principais mecanismos de resistência dos principais agentes antimicrobianos utilizados em medicina dentária.

Fármaco	Mecanismo de acção	Espectro	Principal mecanismo(s) de resistência
β-lactâmicos	Inibição da síntese da parede celular	Aeróbios Gram +	PBP's (Sousa, 2006)
		Aeróbios Gram -	
		Anaeróbios Gram +	
		Anaeróbios Gram -	
Metronidazol	Destabilização DNA	Estritamente anaeróbio e anaeróbios facultativos	Enzimática (5-nitromidazole redutase) (Carlier <i>et al</i> , 1997)
Macrólidos	Inibição da síntese proteica	Gram + (aeróbios e anaeróbios)	Alteração no local alvo (Leclercq e Courvalin, 1991), gene <i>erm</i> (metilase) e proteínas de protecção ribossomal.
Lincosamida	Inibição da síntese proteica	Gram +, actividade complementar em anaeróbios	Alteração no local alvo, inactivação enzimática e efluxo activo (Leclercq e Courvalin, 1991)
Tetraciclina	Inibição da síntese proteica	Gram + e Gram -	Efluxo activo, inactivação enzimática, proteínas de protecção ribossomal (Connell <i>et al</i> , 2003 e Roberts, 1996)

VI. RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos pode ser definida quer genotipicamente, onde é conferida à bactéria a transmissão dos elementos de resistência, quer fenotipicamente, onde as bactérias podem sobreviver e crescer acima de uma determinada quantidade de substância antibacteriana *in vitro*; ou clinicamente, onde, em seres humanos, as bactérias são capazes de se multiplicar na presença determinadas concentrações do fármacos durante a terapêutica (Andersson, 2004). A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos pode ser classificada como natural ou adquirida.

i. RESISTÊNCIA NATURAL

Neste tipo de resistência todos os isolados de uma determinada espécie bacteriana não são sensíveis aos antimicrobianos em questão. As justificações apresentadas para este facto referem a falta de estruturas específicas nas bactérias que funcionam como moléculas alvo para o antimicrobiano ou a falta de um bioprocessos metabólico essencial para a activação do antimicrobiano. Equitativamente, bactérias, sem parede celular (por exemplo, *Mycoplasma* sp.) são naturalmente resistentes aos agentes antimicrobianos β -lactâmicos. Um outro exemplo de resistência natural é o caso dos enterococos e cefalosporinas.

ii. RESISTÊNCIA ADQUIRIDA

Em contraste com a resistência natural, a resistência adquirida é encontrada apenas em alguns isolados de uma determinada espécie bacteriana. Este modelo de resistência evoluiu devido a alterações genéticas, desenvolvidas através de dois mecanismos: mutações cromossômicas no genoma bacteriano preexistente, ou, mais frequentemente, transferência horizontal de genes entre bactérias dentro e fora da mesma espécie.

Na disseminação de genes de resistência ou na transferência horizontal de genes, o gene de resistência tem que ser inserido dentro de um elemento de genético transferível (plasmídeo, transposição e/ou integração). O movimento e a introdução de transposões, integrões ou plasmídeos numa bactéria pode ocorrer através de três mecanismos, particularmente, transformação, transdução, e conjugação (Fig. 20).

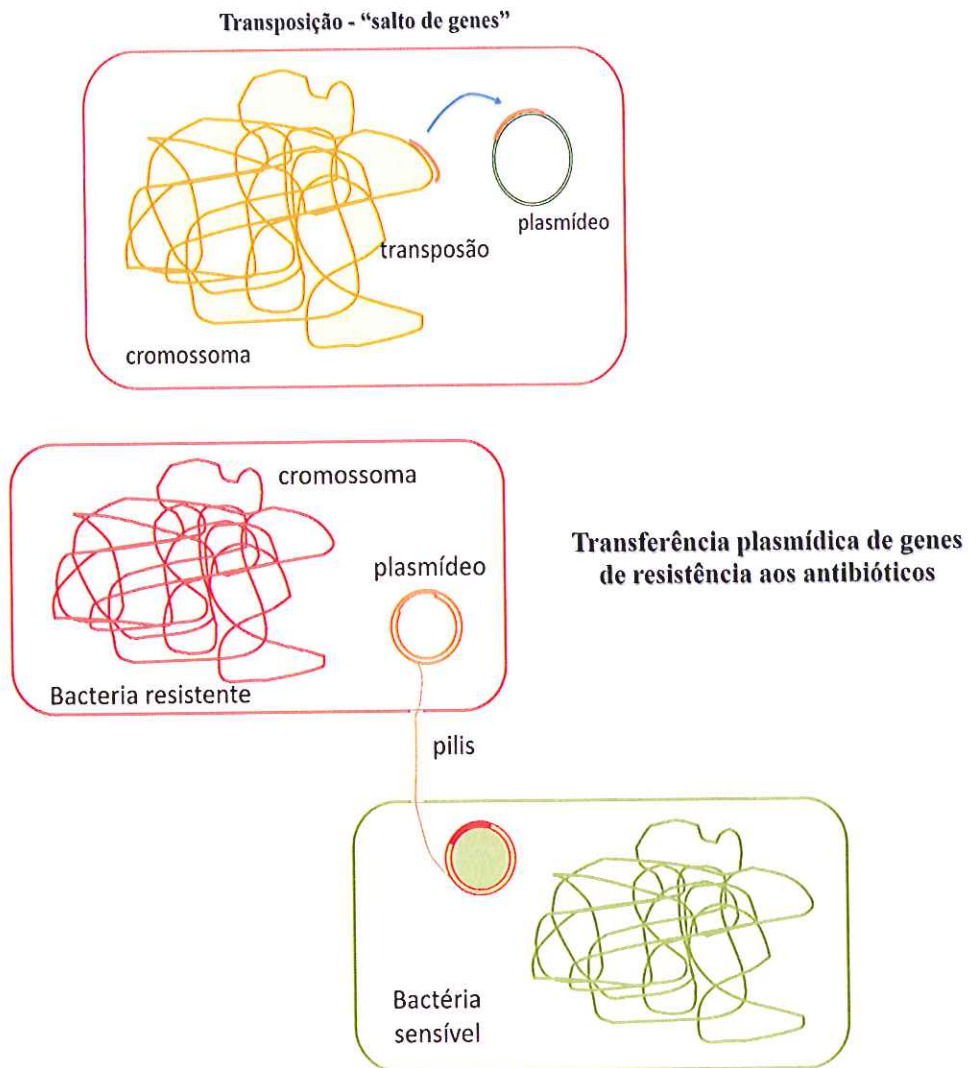


Fig. 20 – Mecanismos de transferência de genes de resistência aos antibióticos entre bactérias.

iii. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Os mecanismos de defesa especializados, codificados pelos genes de resistência adquirida, são utilizados pelas bactérias para a sua sobrevivência num ambiente em que estão presentes antimicrobianos concebidos para erradicá-las. Normalmente, uma ou mais das quatro formas principais, seguidamente enumeradas, são utilizadas pelos microrganismos de forma a tornar o fármaco inactivo (Figura 12) (Andersson, 2004).

(1) Alteração estrutural das moléculas alvo de forma a impedir a ligação do antibiótico. Este mecanismo de resistência é prevalente em cocos de Gram positivo mas com uma menor frequência em bactérias de Gram negativo. É o caso em, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus mitis* e *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes (MRSA).

(2) Exclusão dos antibióticos da entrada para a célula. Vários antibióticos utilizam os canais de porina quando o objectivo é invadir bactérias Gram negativas. Assim, a diminuição da expressão das porinas resulta na impermeabilidade ou na diminuição da captação, o que muitas vezes leva a resistências.

(3) Os antibióticos são bombeados para fora da célula através de um mecanismo de bombas de efluxo. As bactérias podem activar o efluxo do agente antimicrobiano. São consideradas cinco famílias do sistema de efluxo: MFS: *Major Facilitator Superfamily*; RND: *Resistance Nodulation-Division*; SMR: *Small Multidrug Resistance*; ABC: *ATP-Binding Cassette* e MATE: *Multidrug and Toxic Extrusion*.

(4) Os antibióticos são inativos, por exemplo, através de degradação enzimática. O exemplo mais comum para retratar este mecanismo é o de resistência contra antibióticos β -lactâmicos devido às enzimas β -lactamases. Estas enzimas apresentam resistência aos antimicrobianos mais amplamente utilizados na prática médica e odontológica, ou seja, β -lactâmicos.

iv. USO DE ANTIBIÓTICOS VS DESENVOLVIMENTO DE RESISTÊNCIA

O desenvolvimento de resistência é um resultado biológico natural resultante da utilização de antibióticos (Levy e Marshall, 2004). Este facto representa um aspecto particular da evolução bacteriana que é geneticamente determinada e apresenta vantagens em termos de sobrevivência. A pressão selectiva aplicada numa população bacteriana onde os agentes antimicrobianos são usados representa a força proto-motriz para as bactérias resistentes (Levy e Marshall, 2004, Harbarth e Samore, 2005). Assim, os clones de bactérias resistentes têm sido continuamente seleccionados como uma resposta evolutiva da utilização de antibióticos. A magnitude desta selecção é determinada pelo consumo total de antibióticos com particular atenção no que estes agentes são utilizados. Com efeito, a correlação entre o antibiótico usado e a emergência de resistência bacteriana está já bem estabelecida e é claramente demonstrada pela frequência de bactérias resistentes que é consideravelmente mais elevado nos países com um elevado consumo de antibióticos (Goossens *et al*, 2005). No entanto, não está ainda claro a relação quantitativa existente entre o uso de antibióticos e a resistência bacteriana (Austin e Anderson, 1999).

Uma estratégia que tem sido amplamente adoptada para reduzir o rápido aparecimento e posterior difusão de genes de resistência é a de restringir o uso de fármacos antibacterianos (Courvalin, 2005). Apesar de muitos países adoptarem

orientações para o uso de antibióticos, a restrição do seu uso fora da medicina humana, e a melhoria de instrumentos de diagnóstico para as infecções bacterianas, contribuiu para a tendência global do aumento deste fenómeno de resistência. Nos países industrializados, cerca de 80-90% do consumo de antibióticos em seres humanos ocorre na comunidade, e, pelo menos, metade desta é considerada como sendo baseada em prescrições inadequadas, principalmente infecções víricas (Larrabee, 2002 e Wise *et al*, 1998).

São vários os factores de risco para a emergência de perfis de resistência pertinentes, mas não limitados, aos países em desenvolvimento (Larrabee, 2002, Wise *et al*, 1998, Courvalin, 2005). Entre eles estão o fácil acesso e a utilização abusiva de antibióticos, a existência de agentes de qualidade nefasta, e o desrespeito por parte do paciente à prescrição médica. Além disso, a disseminação de bactérias resistentes é facilitada por medidas de controlo de infecção inadequadas, deficiência nos serviços de saúde, em práticas de higiene, saneamento e saúde pública (Austin e Anderson, 1999 e Courvalin, 2005).

A potencial reversibilidade deste factor é uma questão discutível, e as hipóteses de sucesso diferem entre os painéis hospitalares e da comunidade. A fundamentação para a reversibilidade reside no facto de as bactérias resistentes terem uma maior desvantagem em relação a estirpes susceptíveis em ambientes isentos de antibióticos (Levy e Marshall, 2004 e Courvalin, 2005). Assim, uma diminuição no volume de antibióticos utilizados deverá conduzir a uma diminuição da pressão selectiva e numa redução na proporção de bactérias resistentes a um determinado antibiótico. Desta forma, Feres *et al*. comprovou que a prevalência de bactérias subgingivais resistentes à amoxicilina, que surgiram aos 14 dias da terapia, diminuiu de 37% para o valor inicial (0,5%), num total de 90 dias. Supõe-se que a reversibilidade seja maior na comunidade do que num ambiente hospitalar, sobretudo porque o uso contínuo de antibióticos nos hospitais permitirá uma melhor adaptabilidade (Feres *et al*, 2002).

É geralmente aceite que quanto maior for a percentagem de utilização de antimicrobianos, maior é a pressão aplicada na população bacteriana, e logo maior é a emergência de bactérias resistentes. Consequentemente, é fundamental a existência de um circuito de informação detalhada acerca da utilização de antibiótico, bem como cada vez mais se torna indispensável a medição do consumo dos mesmos como reconhecendo-as como medidas efectivas no acompanhamento de novos painéis de resistência.

Neste contexto é evidente que após o diagnóstico microbiológico das periodontites, a execução do antibiograma (Fig. 9) permite ao clínico prescrever os antibióticos segundo as directrizes do laboratório, evitando-se assim a medicação empírica tão generalizada.

VII. CONCLUSÃO

A presença de microrganismos patogênicos torna claro que, para a ocorrência da doença periodontal, os patogênicos são necessários para a instalação e progressão da doença, contudo não suficientes. Assim, a periodontite fica também dependente da existência de determinados factores de risco e genéticos, assim como da resposta imunológica do hospedeiro. No que respeita à severidade da doença, são muitos os estudos que têm vindo a propor uma relação entre a colonização de microrganismos específicos da placa bacteriana em função da presença e/ou severidade da doença periodontal, através de técnicas de diagnóstico de microbiologia clássica e molecular. (Paster *et al.*, 2001 e Rubira *et al.*, 1996).

De uma forma geral, a doença periodontal origina uma alteração no equilíbrio microrganismo-hospedeiro, podendo desta forma provocar alterações locais ou sistémicas que atenuam a resistência do hospedeiro ou até mesmo fomentam alterações quantitativas e/ou qualitativas na microbiota periodontal, resultando num aumento de patogenicidade. São três as espécies de bactérias Gram negativas aeróbias que se destacam devido à sua elevada frequência de aparecimento em lesões periodontais e ao seu potencial patogénico: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Analogamente, foi verificada a existência de uma correlação positiva entre a placa bacteriana e a gravidade da doença periodontal. Muitos autores descrevem que uma boa e rigorosa higiene oral pode reduzir ou eliminar a gengivite. Já no caso da periodontite são necessários cuidados acrescidos, uma vez que os microrganismos podem penetrar o interior dos tecidos; na maior parte das vezes é necessária a utilização de agentes quimioterápicos específicos para a eliminação dos agentes patogénicos.

Uma ampla variedade de testes diagnósticos têm apresentando uma aplicação crescente na periodontia, testes estes que incluem quer tecnologias simples, como a análise directa dos microrganismos da placa bacteriana ao microscópio, quer técnicas mais recentes, como as que envolvem a análise de ácidos nucleicos. A variabilidade e a discordância encontrada nos escassos resultados publicados até à data reflecte a limitação na eficiência da utilização das diferentes metodologias e a especificidade confinada a alguns testes. Assim, o desenvolvimento de novos exames laboratoriais capazes de detectar microrganismos patogénicos associados à doença periodontal decorre do conceito de especificidade da placa bacteriana, da necessidade de identificação de indivíduos de risco, assim como de um diagnóstico mais preciso da doença. Um teste mais sensível é capaz de detectar bactérias em menores proporções, o que pode superestimar dados epidemiológicos, já que, com uma frequência relativa, os microrganismos poderão também ser detectados em locais saudáveis. No entanto, como salienta Di Murro *et al.* (1997), a concentração microbiana é o ponto chave no início e progressão da doença periodontal.

Actualmente, a cultura bacteriana ainda é vista como padrão em relação aos demais testes, pelo facto de fornecer informações a respeito da susceptibilidade dos microrganismos aos agentes antimicrobianos e também por nos elucidar acerca da maior parte das espécies bacterianas presentes nas amostras. Estudos como o de Nakou *et al.* (1998) e MacDonald *et al.* (1998) revelaram resultados bastante satisfatórios com a utilização da cultura bacteriana, apesar desta técnica depender também do tipo de meio de cultura aplicado e do próprio microrganismo, uma vez que muitos não são cultiváveis em laboratório e muitos outros são desconhecidos. O facto da técnica incluir inúmeros passos aumenta a probabilidade de erros que podem afectar os resultados finais, originando uma variação dos mesmos. Inconvenientes como o custo elevado, o tempo e a necessidade de pessoal especializado também devem ser considerados.

Para além dos aspectos de sensibilidade e especificidade devem ser ainda considerados ainda os factores que possibilitam a aplicação destes testes na prática

odontológica. Neste sentido, os que apresentam maior probabilidade de utilização em consultórios, como meios auxiliares de diagnóstico, são os ensaios imunológicos, pelo facto de serem de fácil realização, rápida obtenção de resultados e identificação não só das células bacterianas como dos seus fragmentos ou factores de virulência (Nisengard *et al* 1994 e Genco *et al*, 1997). Todavia, devido ao seu elevado custo, estes exames continuam a ter a sua maior aplicação em trabalhos e pesquisa.

O uso da citometria de fluxo para este tipo de amostras necessita ainda de ser estudada e devem ser elucidadas algumas questões técnicas, pois a necessidade de obtenção de uma suspensão de células única a partir de aglomerados microbianos que constituem a placa representa uma grande limitação (Carranza e Newman, 1997).

Outro teste que se mostrou bastante promissor como auxiliar no diagnóstico periodontal foi o BANA como indicador de risco para perda de inserção periodontal.

A microscopia de campo escuro, apesar de exibir facilidades técnicas na sua aplicação dentro da periodontia apresenta uma baixa especificidade (Carranza e Newman, 1997).

A sensibilidade elevada torna as sondas de DNA capazes de detectar bactérias presentes em proporções muito baixas. Merece destaque, devido a eficácia na tipagem de diferentes espécies bacterianas, a análise de DNA com endonuclease de restrição (Van Steenberg, 1991) cuja maior contribuição no campo da microbiologia oral reside na detecção da grande variabilidade genética entre as espécies (Carranza e Newman, 1997).

Já o PCR é usado tanto para a obtenção de dados epidemiológicos como na caracterização de genótipos bacterianos.

As enzimas e os mediadores químicos presentes no sulco gengival podem retratar a patologia periodontal uma vez que as reacções metabólicas e bioquímicas antecedem à lesão clinicamente diagnosticável. Assim, testes com marcadores bioquímicos apesar de promissores, é desconhecido o seu potencial como base para testes de diagnóstico, sendo que estudos clínicos adicionais são necessários para melhor avaliar o seu valor.

Na verdade, a presença de uma microbiota subgengival patogénica está relacionada com o risco aumentado da instalação ou progressão da doença periodontal. Espera-se que no futuro, pesquisas forneçam testes capazes de distinguir as bactérias virulentas das não virulentas, e de diferenciar microrganismos endógenos e exógenos do sulco gengival, caracterizando indivíduos susceptíveis ou resistentes à doença periodontal. Além disso é necessário estabelecer o número de patogénicos necessário para induzir doença, pois só assim o clínico será capaz de interferir no curso da doença, reduzindo o início da patologia periodontal.

As doenças de origem microbiana foram, na era pré-antibiótica, a principal causa de morte no Homem. Assim, os antibióticos e outros agentes antimicrobianos têm vindo a revolucionar o tratamento das doenças infecciosas desde a sua introdução no início do século passado. A sua escolha deve ter em conta a etiologia da infecção, a susceptibilidade do microrganismo, dosagem apropriada, via de administração e duração terapêutica. Como referiu Sousa (2006) *prescrever um antibiótico é um acto de inteligência e não um acto fortuito.*

Já em 1945, Fleming, advertiu a comunidade científica para o possível risco da resistência aos antibióticos. A utilização prolongada de diferentes antibióticos levou à emergência de bactérias infecciosas que são resistentes não só a um, mas a vários antibióticos. Como resultado, existem hoje estirpes de bactérias para as quais só está disponível um único tratamento de fármacos eficaz, ou, em alguns casos, nenhum (Falagas e Bliziotis, 2007). Assim, a resistência antimicrobiana é agora considerada uma grave ameaça para a saúde pública e o seu controlo é uma prioridade internacional. Também em odontologia a resistência a antibióticos é objecto de grande preocupação, uma vez que ao longo dos anos, foi reportada uma diminuição na prescrição de fármacos de espectro estreito comparativamente com os de amplo espectro, cognominando no aparecimento bactérias resistentes (Levy e Marshall, 2004).

Resultados obtidos em Espanha com bactérias odontopatogénicas permitem conhecer o perfil de susceptibilidade das estirpes em relação aos antibióticos (em anexo). A Espanha tal como Portugal são países com grande consumo de antibióticos, pelo que é de esperar níveis significativos de resistência aos antibióticos. Os resultados em anexo permitem demonstrar essa realidade.

A realidade portuguesa não é conhecida, tornando-se portanto imperioso avaliar o nível de resistência aos antibióticos nas estirpes odontopatogénicas. Tal só é possível com a realização dos testes laboratoriais para o tratamento das periondontites, como defendemos nesta monografia, em vez do uso sistemático do tratamento empírico destas infecções.

Para além das consequências médicas, a resistência aos antibióticos está associada a grandes custos sociais. O exemplo mais concreto e mais mensurável é o custo dos fármacos, como novos tratamentos empíricos necessários para combater a patogénicos resistentes.

Nos últimos anos, a compreensão do modo como estes microrganismos resistem ao efeito dos fármacos e o estabelecimento de políticas nacionais orientativas sobre quando e como estes agentes devem ser utilizados, levou a que os profissionais de saúde se posicionassem mais cautelosos. No entanto, o uso de antibióticos e o seu fácil acesso ainda representa um problema na maior parte dos países.

Como referiu Felix Marti-Ibanez (1955) “*Antibiotic therapy, if indiscriminately used, may turn out to be a medicinal flood that temporarily cleans and heals, but ultimately destroys life itself*”, corroborando com Sousa (2006) que refere que *as bactérias são melhores engenheiros genéticos que o Homem*, daí que problemas com resistência continuamente ressurgirão, e conseqüentemente novos desafios para os profissionais da área.

Este trabalho pretende pôr em evidência a importância da flora bacteriana associada à infecção periodontal e o seu tratamento. Com o aparecimento das tecnologias de Biologia Molecular vai ser possível fazer o diagnóstico laboratorial destas infecções de um modo rápido e eficaz. Apresentam ainda o inconveniente do custo, que, infelizmente, vai servir de pretexto para se continuar com o tratamento empírico destas infecções.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Addy, L.D., Martin, M.V. (2005) Clindamycin and dentistry. *Br Dent Journal*. 199(1):23-6.
- American Academy of Periodontology. (1994). *Periodontal disease management*. Chicago. pp. 115-125).
- American Academy of Periodontology. (1999). *International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions*. *Annals of Periodontol*. 4(1):8-38.
- Andersson, D. (2004). *The ways in which bacteria resist antibiotics* (background document). Seminar on the Global Threat of Antibiotic Resistance – Exploring Roads Towards Concerted Action.
- Austin, D.J., Anderson, R.M. (1999). Studies of antibiotic resistance within the patient, hospitals and the community using simple mathematical models. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 354(1384):721-38.
- Black, J.(1999). *Microbiology-Principles and explorations*. Wiley.
- Bolstad, A.I., Jensen, H.B., Bakken, V. (1996). Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin Microbiol Rev*. 9(1):55-71.
- Bradshaw, D.J., Marsh, P.D., Watson, G.K., Allison, C. (1998). Role of *Fusobacterium nucleatum* and coaggregation in anaerobe survival in planktonic and biofilm oral microbial communities during aeration. *Infect Immun*.66(10):4729-32.
- Cardoso, R. J. A.; Gonçalves, E. A. N. (2002). *Periodontia-Cirurgia para Implantantes-Cirurgia Anestesiologia*. São Paulo: Artes Médicas. 5:1.

Carlier, J.P., Sellier, N., Rager, M.N., Reysset, G. (1997). Metabolism of a 5-nitroimidazole in susceptible and resistant isogenic strains of *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(7):1495-9.

Carranza, J. F.A. e Newman, M.G. (1997). *Periodontia clinica*. 8. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan. pp. 399-414.

Clarridge, J. E. (2004). Impact of rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infections diseases. *Clin. Microb. Rev.* 17:840-862.

Connell, S.R., Tracz, D.M., Nierhaus, K.H., Taylor, D.E. (2003). Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(12):3675-81.

Courvalin, P. (2005) Antimicrobial Drug Resistance: "Prediction Is Very Difficult, Especially about the Future". *Emerg Infect Dis.* 11(12):1503-6

Dahlén, G. *et al.* (1992). Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor bucal hygiene. *Journal Clin. Periodontol.* (19):35-42.

Di Murro, C. *et al.* (1997). Occurrence of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus* and *Treponema denticola* in periodontally healthy and diseased subjects as determined by an ELISA technique. *J. Periodontol.* 68(1):18- 23.

Dzink, J.L., Sheenan, M.T., Socransky, S.S. (1990). Proposal of three subspecies of *Fusobacterium nucleatum* Knorr 1922: *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* subsp. nov., comb. nov.; *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* subsp. nov., nom. rev., comb. nov.; and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *vincentii* subsp. nov., nom. rev., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 40(1):74-8.

Ellen, R.P., Kuramitsu, H.K.(2000).*Oral bacterial ecology: the molecular basis*. Horizon Scientific Press,pp. 11-65.

Epstein, J.B., Chong, S., Le, N.D. (2000). A survey of antibiotic use in dentistry. *J Am Dent Assoc*. 131(11):1600-9.

Falagas, M.E., Bliziotis, I.A. (2007). Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents*.

Faria-Almeida, R., Navarro, A., Bascones, A. (2006). Clinical and metabolic changes after conventional treatment of type 2 diabetic patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 77 (4):591-8.

Feres, M, Haffajee, A.D., Allard, K., Som, S., Goodson, J.M., Socransky, S.S. (2002) Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol*.29(8):724-35.

Genco, R.J., Cohen, D.W. e Goldman, H.M. (1997). *Periodontia contemporânea*. 2 ed. rev. São Paulo : Ed. Santos. 37. pp. 449-58.

Ghannoum, M. e O'Toole, G. A. (2004). *Microbial Biofilms*. Eds American Society for Microbiology.

Gharbia, S.E., Shah, H.N. (1992). *Fusobacterium nucleatum* subsp. *fusiforme* subsp. nov. and *Fusobacterium nucleatum* subsp. *animalis* subsp. nov. as additional subspecies within *Fusobacterium nucleatum*. *Int J Syst Bacteriol*. 42(2):296-8.

Golub, L.M., Lee, H.M., Ryan, M.E., Giannobile, W.V., Payne, J., Sorsa, T. (1998). Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res*. 12(2):12-26.

Goossens, H., Ferech, M., Vander, S. R., Elseviers, M.(2005). Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet*. 365(9459):579-87.

Haraszthy, V.I., Zambon, J.J., Trevisan, M., Zeid, M., Genco, R.J.(2000). Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J Periodontol*. 71 (10): 1554-60.

Harbarth, S., Samore, M.H. (2005). Antimicrobial resistance determinants and future control. *Emerg Infect Dis*.11(6):794-801.

Hirschfeld, L., Wasserman, B. (1978). A long-term survey of tooth loss in 600 treated periodontal patients. *J Periodontol*. 49 (5): 225-37.

Jousimies-Somer, H. (1997). Recently described clinically important anaerobic bacteria: taxonomic aspects and update. *Clin Infect Dis*. 25 (2) :S78-87.

Kaldahl, W.B., Kalkwarf, K.L., Patil, K.D., Molvar, M.P., Dyer, J.K..(1996). Long-term evaluation of periodontal therapy I: response to 4 therapeutic modalities. *J Periodontol*. 67(2):93-102.

Kinder, S.A., Holt, S.C., Korman, K.S. (1986). Penicillin resistance in the subgingival microbiota associated with adult periodontitis. *J Clin Microbiol*. 23(6):1127-33.

Kolenbrander, P.E., Andersen, R.N., Moore, L.V. (1989). Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infect Immun*. 57(10):3194-203.

Kornman, S.K., Page, R.C. (2000). The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*.14: 9-12.

Kornman, K. S. (1986). The role of supragingival plaque in the prevention and treatment of periodontal diseases. *J. Periodontol.*21:5-22.

Krigar, D.M., Kaltschmitt, J., Krieger, J.K., Eickholz, P. (2007). Two subgingival plaque-sampling strategies used with RNA probes. *J Periodontol.* 78(1):72-8.

Larrabee, T. (2002). Prescribing practices that promote antibiotic resistance: strategies for change. *J Pediatr Nurs.*17(2):126-32.

Leclercq R, Courvalin P. (1991). Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(7):1267-72.

Leclercq R, Courvalin P. (1991). Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 35(7):1273-6.

Leivadaros, E., van der Velden, U., Bizzarro, S., ten Heggeler, J.M., Gerdes, V.E., Hoek, F.J., *et al.*(2005). A pilot study into measurements of markers of atherosclerosis in periodontitis. *J Periodontol.* 76 (1): 121-8.

Levy, S.B., Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med.* 10(12):S122-9.

Lindhe, J., Karring, T., Lang, N.P. (2003). *Clinical periodontology and implant dentistry.* 4th edition. Copenhagen: Blakwell Munksgaard.

Listgarten, M.A. *et al.* (1983). Comparative differential dark field microscopy of subgingival bacteria. *J. Periodontol.* 54 (1), pp. 92-107.

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

Loesche, W.J. (1992). DNA probe and enzyme analysis in periodontal diagnostics. *J. Periodontol.* 63: (11): 1102-9.

Loesche, W. J., E Syed, S.A. (1978). Bacteriology of human experimental gingivitis: effect of plaque and gingivitis score. *Infect. Immun.* 21: 830-839.

Loesche, W.J. *et al.* (1990). Mult-center clinical evaluation of a chairside method for detecting certain periodontopathic bacteria in periodontal disease. *J. Periodontol.* 61: (3): 189-96.

Longman, L.P., Martin, M.V. (1999). A practical guide to antibiotic prophylaxis in restorative dentistry. *Dent Update.* 26(1):7-14.

MacDonald, E. S. *et al.* (1998). Clinical and microbiological evaluation of a bioassorbable barrier membrane in the treatment of periodontal intraosseous lesions. *J. Periodontol.* 4 (69):445-53.

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

McDonald, R.E., Avery, D. R. (1995). *Odontopediatria.* 6ed. Rio de Janeiro: Huanabara-Koogan. Cap. 2, pp: 310-341.

Melvin, W.L. *et al.* (1994). Comparison of DNA probe and ELISA microbial analysis methods and their association with adult periodontitis. *J. Periodontol.* 65 (6):576-82.

Meyer, J. *et al.* (1994). Active and a-1 proteinase inhibitor complexed leukocyte. *J. Periodontol.* 65(5):423-8.

Moore, W. E. e Moore, L. V. (1994). The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol* 5:66-77.

Moritz, E.M., Hergenrother, P.J. (2007). The Prevalence of Plasmids and Other Mobile Genetic Elements in Clinically Important Drug-resistant Bacteria. 3: 25-53.

Nakou, M. *et al.* (1998). Subgingival microflora associated with nifedipine- induced gingival overgrowth. *J. Periodontol.* 69 (6): 664-9.

Nisengard, R.J. *et al.* (1992). Development of a rapid latex agglutination test for periodontal pathogens. *J. Periodontol.* 63 (7): 611-7.

Nisengard, R.J., Newman, M.G. (1994). *Oral microbiology and immunology.* 2 ed. Philadelphia : W.B. Saunders. 34: pp. 435-49.

Nester, *et al.*(2000). *Microbiology – A human perspective.* McGraw-Hill.

Newman, M. G. *et al.* (1978). Predominant microbiota associated with periodontal health in the aged. *Journal Periodontology.* 49:553-559.

Noiri, Y.; *et al.*(2001). The localization of periodontal-disease-associated bacteria in human periodontal pockets. *J. Dent. Res.* 80(10):1930-1934.

Nyfors, S., Kononen, E., Takala, A., Jousimies-Somer, H. (1999). Beta-lactamase production by oral anaerobic gram-negative species in infants in relation to previous antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.* 43(7):1591-4.

Offenbacher, S., Jared, H.L., O'Reilly, P.G., Wells, S.R., Salvi, G.E., Lawrence, H.P., *et al.* (1998). Potencial pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. *Ann Periodontol.* 3 (1): 233-50.

Palmer, N. O., Martin, M.V., Pealing, R., Ireland, R.S. (2000) . An analysis of antibiotic prescriptions from general dental practitioners in England. *J Antimicrob Chemother.* 46(6):1033-5.

Paster, B. J. *et al.* (2001). Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology*. 12:3770-3783.

Pennisi E. (2005). A mouthful of microbes. *Science*. 307(5717):1899-901.

Petersen, P.E., Ogawa, H. (2005). Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach. *J Periodontol*. 76(12):2187-93.

Kononen, E., Nyfors, S., Syrjanen, R., Komulainen, E., Jousimies-Somer, H. (2003). Emergence of penicillin resistance among *Fusobacterium nucleatum* populations of commensal oral flora during early childhood. *J Antimicrob Chemother*. 51(1):107-12.

Raber, D. J. E. *et al.* (1994). Experimental gingivitis during pregnancy and postpartum: clinical, endocrinological, and microbiological aspects. *J. Clin. Periodontol*. 21:549-558.

Richard, J. Lamont, M.S.L., Robert, A.B., Donald, J. L. (2006). *Antibiotics and Treatment of Infectious Diseases*. Oral Microbiology and Immunology Washington, DC: ASM Press. pp. 393 - 422.

Roberts, M.C. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol Rev*. 19(1):1-24.

Roberts, M.C. (2002). Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. *Periodontol*. 2000. 28:280-97.

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

Rubira, I. R. F. *et al.* (1996). Pesquisa de bactérias bucais em amostras de placa subgingival de indivíduos com o periodonto normal e de portadores de periodontite

através da técnica do “SLOT IMMUNOBLOT”. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo.* 10(3): 181-187.

Ryan, M.E., Ashley, R.A. (1998) How do tetracyclines work? *Adv Dent Res.* 12(2):149-51.

Samaranayake, L.P. (2006). *Antimicrobial chemotherapy.* Essential Microbiology for Dentistry Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier. pp. 67 - 76.

Sbordone, L, Bortolaia, C. (2003). Oral microbial biofilms and plaque-related diseases: microbial communities and their role in the shift from oral health to disease. *Clin Oral Investig.* 7(4):181-8.

Schlegel--Brenzenzer, B. *et al.* (1998), Clinical and microbiological findings in elderly subjects with gingivitis or periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 25: 897-907.

Seymour, R.A., Preshaw, P.M., Thomason, J.M., Ellis, J.S., Steele, J.G. (2003). Cardiovascular disease and periodontology. *Journal Clin Periodontol.* 30 (4): 279-92.

Slots J, Ting M. (2002). Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 28:106-76.

Slots, J. (1977). Microflora in the healthy gingival sulcus in man. *Scand. J. Dent. Res.* 85: 247-254.

Socransky, S. S.; Haffajee, A. D. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. *J. Periodontol.* 63:322-327.

Socransky, S. S. *et al.* (1998). Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiology.* (3):1-7.

Socransky, S. S.; Haffajee, A. D. (2000). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol.* 2000. 5: 7-25.

Sousa, J. C. (2006). *Manual de Antibióticos Antibacterianos*. 2ª ed. Universidade Fernando Pessoa. Porto.

Takemoto, T., Hino, T., Yoshida, M., Nakanishi, K., Shirakawa, M., Okamoto, H. (1995). Characteristics of multimodal co-aggregation between *Fusobacterium nucleatum* and streptococci. *J Periodontal Res.* 30(4):252-7.

Tanner, A.; Kent, R.; Maiden, M. A. (1996). Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *J. Periodont. Res.* 31:195-204.

Terpenning, M.S., Taylor, G.W., Lopatin, D.E., Kinder-Kerr, C., Dominguez, B.L., Loesche, W.J. (2001). Aspiration pneumonia: dental and oral risk factors in an older veteran population. *J Am Geriatr Soc.* 49 (5): 557-63.

Toledo, O. A.(1996). *Odontopediatria: fundamento para prática clínica*. 2ed. São Paulo: Editorial Premier. Cap5, pp. 89-103.

Tong, D.C., Rothwell, B.R. (2000). Antibiotic prophylaxis in dentistry: a review and practice recommendations. *J Am Dent Assoc.* 131(3):366-74.

Tuner, K., Lindqvist, L., Nord, C.E. (1985). Purification and properties of a novel beta lactamase from *Fusobacterium nucleatum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 27(6):943-7.

Van Steenberg, T.J.M. *et al.* (1991). Microflora and bacterial DNA restriction enzyme analysis in young adults with periodontitis. *J. Periodontol.* 62 (3): 235-41.

Walker, C.B., Niebloom, T.A., Socransky, S.S. (1979). Agar medium for use in susceptibility testing of bacteria from human periodontal pockets. *Antimicrob Agents Chemother.* 16(4):452-7.

Wilson, M. (2001). Bacterial biofilms and human disease. *Science Progress.* 84 (3):235-254.

Wilson, M. J.; Weightmen, A. J.; Wade, W. G. (1997). Applications of molecular ecology in the characterization of uncultured microorganisms associated with human disease. *Rev. Med. Microbiol.* 8:91-101.

Wise, R., Hart, T., Cars, O., Streulens, M., Helmuth, R., Huovinen, P., *et al.* (1998). Antimicrobial resistance. Is a major threat to public health. *Bmj.* 317(7159):609-10.

World Health Organization: The World Health Report. (2002). Reducing risks, promoting healthy life. Geneva: World Health Organization.

Ximenez-Fyvie, L. A., Haffajee, A. D. e Socransky, .SS. (2000). Comparison of the microbiota of supraand subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal Clin Periodontol.* 27(9):648-57.

Zambon, J. J. (1996). Periodontal Diseases: Microbial Factors. *Annals of Periodontology.* 1:879-925.

Zambon, J. J., Haraszthy, V. I. (1995). The laboratory diagnosis of periodontal infections. *Periodontology 2000.* 7(1): 69- 82.

Zucol, F. *et al* (2006). Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J.Clin.Microbiol.* 44(8):2750-2759.

ANEXO

Original

Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain

J.R. Maestre,¹ A. Bascones,² P. Sánchez,¹ P. Matesanz,² L. Aguilar,³ M.J. Giménez,³ I. Pérez-Balcabao,¹ J.J. Granizo⁴ and J. Prieto³

¹Department of Microbiology, Hospital Central de la Defensa Gómez Ulla, Madrid, Spain; ²Department of Stomatology, School of Dentistry, Universidad Complutense, Madrid, Spain; ³Department of Microbiology, School of Medicine, Universidad Complutense, Madrid, Spain; ⁴Department of Epidemiology, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, Spain

SUMMARY

Resistance in streptococci or Gram-negative bacteria is associated with antibiotic consumption. Scarce information exists on the antibiotic susceptibility of bacterial isolates from patients with periodontitis in countries with high antibiotic consumption, as this is an area in which microbiological testing is not performed in daily practice. The present study was undertaken to explore the susceptibility of bacterial isolates in periodontitis to antibiotics prescribed in odontology in Spain as treatment for local infections or prophylaxis for distant focal infections. Periodontal samples were prospectively collected in 48 patients classified by pocket depth of <4 mm and ≥ 4 mm. Species were identified by culture, selecting the five most frequent morphotypes per sample, and polymerase chain reaction (PCR). Susceptibility was determined by Etest®. A total of 261 isolates were identified: 72.9% patients had *Streptococcus oralis*, 70.8% *Streptococcus mitis*, 60.4% *Prevotella buccae*, 39.6% *Prevotella denticola*, 37.5% *Fusobacterium nucleatum*, 35.4% *Prevotella intermedia*, 25% *Capnocytophaga* spp., 23% *Veillonella* spp., 22.9% *Prevotella melaninogenica* and *Streptococcus sanguis*, and <20% other species. *Streptococcus viridans* resistance rates were 0% for amoxicillin, <10% for clindamycin, 9-22% for tetracycline, and for azithromycin ranged from 10.2% for *S. sanguis* to 47.7% for *S. mitis*. *Prevotella* isolates were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, with amoxicillin resistance ranging from 17.1% in *P. buccae* to 26.3% in *P. denticola*. Metronidazole resistance was <6% in all *Prevotella* species, while clindamycin resistance ranged from 0 to 21.1%. β -Lactamase production was positive in 54.1% *Prevotella* spp., 38.9% *F. nucleatum*, 30% *Capnocytophaga* spp., and 10% *Veillonella* spp. In this study, amoxicillin-clavulanic acid was the most active antibiotic against all species tested, followed by metronidazole in the case of anaerobes.

Key words: Periodontopathogens - Antibiotics - Susceptibility - Periodontitis

Enfermedad periodontal, odontopatógenos y perfil de resistencia a los antibióticos habitualmente utilizados como tratamiento o profilaxis en odontología en España

RESUMEN

La resistencia de los estreptococos o de las bacterias gramnegativas se asocia al consumo antibiótico, pero existe escasa información sobre la sensibilidad de los aislamientos de pacientes con periodontitis en los países con alto consumo de antibióticos, como es España, datos que pueden ser importantes cuando en la práctica diaria no se realizan determinaciones microbiológicas. En este estudio se analiza la sensibilidad de aislamientos de periodontitis a los antibióticos prescritos habitualmente en España en odontología para el tratamiento de infecciones

locales o la profilaxis de infecciones a distancia. Se tomaron de forma prospectiva muestras periodontales de 48 pacientes clasificados, según la profundidad de la bolsa, en dos grupos: <4 mm y >4 mm. La identificación de las especies se realizó por PCR y por cultivo, seleccionando los cinco morfotipos más frecuentes en cada muestra. La sensibilidad antibiótica se determinó por E-test®. Se identificaron 261 cepas. El 72,9% de los pacientes presentaron *Streptococcus oralis*, el 70,8% *Streptococcus mitis*, el 60,4% *Prevotella buccae*, el 39,6% *Prevotella denticola*, el 37,5% *Fusobacterium nucleatum*, el 35,4% *Prevotella intermedia*, el 25% *Capnocytophaga spp.*, el 23% *Veillonella spp.*, el 22,9% *Prevotella melaninogenica* y *Streptococcus sanguis*, y <20% otras especies. Las tasas de resistencia de *S. viridans* fueron 0% a la amoxicilina, >10% a la clindamicina y 9% a 22% a la tetraciclina; se halló resistencia a la azitromicina entre el 18,2% de *S. sanguis* y el 47,7% de *S. mitis*. Los aislamientos de *Prevotella* fueron sensibles a la amoxicilina-ácido clavulánico. La resistencia a la amoxicilina osciló entre el 17,1% de *P. buccae* y el 26,3% de *P. denticola*. La resistencia al metronidazol fue <6% en las especies de *Prevotella*, mientras que a la clindamicina osciló entre un 0% y un 21,1%. El 54,1% de *Prevotella spp.*, el 38,9% de *F. nucleatum*, el 30% de *Capnocytophaga spp.* y el 10% de *Veillonella spp.* eran productores de betalactamasas. Amoxicilina-ácido clavulánico fue el antibiótico más activo frente a todas las especies aisladas, seguido del metronidazol en el caso de los anaerobios.

Palabras clave: Periodontopatógenos - Antibióticos - Sensibilidad - Periodontitis

INTRODUCTION

The pathogenic potential of odontopathogens in odontogenic infections is determined by initial factors in the dentine lesions (1). In dental caries, the dominant bacterial group depends on the invasion of dental surfaces by bacterial species present in saliva and/or the supragingival plaque, and the progression of the lesion depends on the prevalence of acidogenic bacteria. The need for new nutritional resources leads to the migration of proteolytic bacteria to dentine tubules, from which radicular surfaces and subgingival plaque can be recolonized in the case of periodontitis (2). Debridement can select periodontopathogens, and this, together with the difficulty in controlling bacterial plaque biofilms, can explain the 20% failure rate of mechanical treatment (3). In this particular field a clinical efficacy rate of 80% is well accepted (4), and therefore a shift from a mechanical to a pharmacological, or to a mechanical plus pharmacological therapeutic approach is difficult, despite the demonstrated effectiveness of antibiotics that decrease anaerobic bacterial levels (5). Nonspecific bacterial growth and subsequent inflammatory disease have been postulated as one possible origin of periodontitis. In daily practice, antibiotic treatment is used in 20% of failures obtained after mechanical treatment, *i.e.*, refractory periodontitis (5).

Monitoring susceptibility of periodontal isolates may be important not only for treatment selection, but also for prevention of local or systemic infections after dental procedures and oral surgery when prophylaxis is indicated according to patient and procedure characteristics. Since 30% of the adult population has periodontitis with a gingival pocket depth of >4 mm (5), these periodontal isolates may be present in 30% of dental procedures and oral surgery. Local infectious complications are polymicrobial, with an

aerobic/anaerobic component (6), while systemic infections occur after monomicrobial bacteremia in patients with underlying diseases. *Streptococcus viridans* bacteremia can be detected after dental manipulation in 75% and 30% patients with and without periodontal disease, respectively (7). Four to seven per cent of these bacteremias are due to periodontopathogens of the *Haemophilus spp.*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Cardiobacterium hominis*, *Eikenella corrodens* and *Kingella spp.* (HACEK) group (8), and anaerobic bacteremias can be detected when using adequate microbiological procedures (9).

This study explores bacterial isolates in patients with periodontitis and the antibiotic susceptibility to different antibiotics commonly prescribed as treatment or prophylaxis in odontology in Spain, a country with high antibiotic consumption, which is the main driving force for resistance in some species of the genus streptococci (10).

MATERIALS AND METHODS

Periodontal samples were collected prospectively in 48 patients treated at the Stomatology Department of the School of Dentistry at the Complutense University, Madrid, Spain, from January to May 2005. Adult patients aged at least 18 years and with a diagnosis of periodontitis were included. Patients who had received antimicrobial therapy in the previous 30 days were excluded. Samples were collected using four sterile paper points inserted gently into the subgingival sulcus after cleaning of the supragingival plaque; contamination by saliva was avoided. The paper points were left *in situ* for 10 sec. Two paper points were introduced into a sealed sterile tube and sent to the laboratory (Sanilab Molecular, Madrid, Spain) for polymerase chain reaction (PCR) testing (*A. actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Tanne-*

rella forsythensis, *Treponema denticola*) using *micro-IDent*[®] test (Hain Lifescience GmbH., Nehren, Germany). The other two paper points were placed in a sealed sterile vial containing transport medium (anaerobic thioglycolate broth enriched with vitamin K and hemine; bioMedics, Madrid, Spain). The vials were maintained in a prereduced environment obtained using an anaerobic atmosphere generator (*Anaerogen*[™]; Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) and sent to the laboratory (Department of Microbiology, Hospital Central de la Defensa, Madrid, Spain). Bacteriological procedures were performed no later than 60 min after sample collection. Inoculated thioglycolate tubes were agitated for 30 sec, and the homogenized sample was seeded using 0.02 ml per plate onto Columbia blood agar, enriched VX chocolate agar, colistin-nalidixic agar, McConkey agar, Schaedler agar and BBE amikacin agar (bioMedics). Additionally, 0.05 ml was seeded in a new enriched vitamin K and hemine anaerobic thioglycolate broth (bioMedics). Incubation was performed at 35 °C in an aerobic 5% CO₂-enriched atmosphere and in anaerobic conditions for culture of strict anaerobes using an anaerobic atmosphere generator. Plates were read on day 2 and day 7 after the initial processing, and after the plating from the enriched thioglycolate broth. Five of the most frequent morphotypes per sample were selected, isolated and frozen until identification and determination of susceptibility processes began.

Identification was performed using the following systems for aerobic and facultative bacteria: rapid ID 32 Strep (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), ID GPC Vitek2 (bioMérieux), and ID GP Wider (Soria Melguizo, S.A., Madrid, Spain). Anaerobic bacteria were identified using rapid ID 32 A (bioMérieux). β -Lactamase production was determined using cefinase discs with nitrocefin (BBL Cefinase Discs, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA).

The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for amoxicillin/clavulanic acid, amoxicillin, clindamycin, metronidazole, tetracycline and azithromycin, with antibiotic concentrations ranging from 0.02 to 256 mg/l, by *E-test*[®] (AB Biodisk, Solna, Sweden) in blood agar Columbia (bioMedics), and in enriched vitamin K, hemine, and 5% sheep blood *Brucella* agar (Reactivos para Diagnóstico S.L., Barcelona, Spain). *Bacteroides fragilis* ATCC 25285 was used as control strain. NCCLS/CLSI susceptibility and resistance breakpoints (mg/l) were considered (11, 12): amoxicillin/clavulanic acid $\leq 4/2$ mg/l and $\geq 16/8$ mg/l; amoxicillin ≤ 4 mg/l and ≥ 16 mg/l; clindamycin ≤ 2 mg/l and ≥ 8 mg/l; metronidazole ≤ 8 mg/l and ≥ 32 mg/l; tetracycline ≤ 4 mg/l and ≥ 16 mg/l for anaerobic bacteria, respectively; and amoxicillin/clavulanic acid $\leq 0.25/0.12$ mg/l and $\geq 8/4$ mg/l; amoxicillin ≤ 0.25 mg/l and ≥ 8 mg/l; clindamycin

≤ 0.25 mg/l and ≥ 1 mg/l; tetracycline ≤ 2 mg/l and ≥ 8 mg/l; and azithromycin ≤ 0.5 mg/l and ≥ 2 mg/l for streptococci, respectively.

Statistical methods

Analysis was performed using SPSS version 9.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Comparisons between proportions were performed by Chi-square test or Fisher's exact test when necessary. Quantitative variables not following normality distribution were compared using the Mann-Whitney test.

RESULTS

Samples were collected in patients diagnosed with periodontitis with the following characteristics: age (mean \pm SD) 50.0 \pm 10.6 years (range 26-75); gender: 31 females and 17 males; and 14 smokers and 34 nonsmokers. Fourteen patients presented pocket depths of <4 mm and 34 patients depths of ≥ 4 mm.

PCR yielded positive results for *T. forsythensis* in 70.8% patients (34 of 48), for *T. denticola* in 62.5% (30 of 48), for *P. gingivalis* in 58.3% (28 of 48), for *P. intermedia* in 37.5% (18 of 48), and *A. actinomycetemcomitans* in 10.4% (five of 48). There was no relationship with gender or smoking status, because differences between smokers and nonsmokers did not reach statistical significance, e.g., *T. forsythensis* (92.3% vs. 65.7%; $p=0.08$) and *T. denticola* (84.6% vs. 57.1%; $p=0.09$). However, PCR detection of *T. denticola* was significantly higher ($p=0.01$) in patients with pocket depth of ≥ 4 mm versus those with pocket depth of <4 mm (76.5% vs. 35.7%). In the case of *P. gingivalis* and *T. forsythensis*, differences between patients with pocket depths of ≥ 4 mm and <4 mm did not reach statistical significance: 67.6% vs. 35.7% ($p=0.057$) for *P. gingivalis* and 79.4% vs. 57.1% ($p=0.1$) for *T. forsythensis*, respectively.

A total of 261 isolates were obtained (representing a mean 5.4 isolates per patient): 47.9% of them were streptococci from the viridans group, 32.6% of them belonged to the genus *Prevotella*, 6.9% to the genus *Fusobacterium*, 4.6% to the genus *Capnocytophaga*, 3.8% to the genus *Veillonella*, and $<1.5\%$ to other genera such as *Gemella*, *Actinomyces*, and others.

The isolation rates (frequency per 100 patients) for the different species were 72.9% for *S. oralis*; 70.8% for *S. mitis*; 60.4% for *P. buccae*; 39.6% for *P. denticola*; 37.5% for *Fusobacterium nucleatum*; 35.4% for *P. intermedia*; 25%

for *Capnocytophaga* spp.; 23% for *Veillonella* spp.; 22.9% for *P. melaninogenica* and *S. sanguis*; and <20% for other species. Isolation rates were not related in any case to pocket depth, gender or age of patients. Isolation of *P. buccae* was significantly higher in smokers versus nonsmokers (84.6% vs. 51.4%; $p = 0.049$) while isolation of *P. denticola* was significantly higher in nonsmokers (48.6% vs. 15.4%; $p = 0.049$).

β -Lactamase production was positive in 54.1% of *Prevotella*, in 38.9% of *F. nucleatum*, in 30% of *Capnocytophaga*, and in 10% of *Veillonella*.

The antimicrobial susceptibility (range, MIC₅₀ and MIC₉₀) and percentage of susceptible, intermediate and resistant strains for the different species are shown in Table I. Resistance rates of streptococci from the viridans group was 0% to amoxicillin/clavulanic acid or amoxicillin, around 10% for clindamycin (except for *S. sanguis* which had a resistance rate of 0%), from 9-22% for tetracycline, and the highest resistance rates corresponded to the macrolide azithromycin which ranged from 18.2% for *S. sanguis* to 47.7% for the most frequently isolated *S. mitis*.

All *Prevotella* isolates were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, while amoxicillin exhibited resistance rates ranging from 17.1% in *P. buccae* to 26.3% in *P. denticola*. Metronidazole resistance rates were below 6% in all *Prevotella* species, while clindamycin resistance ranged from 0% to 21.1%. All *Veillonella* spp. exhibited susceptibility to all antibiotics tested, while all *F. nucleatum* were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, clindamycin and metronidazole.

Against *Capnocytophaga*, amoxicillin-clavulanic acid and clindamycin exhibited the highest *in vitro* activity, with MIC₉₀ values of 0.25 and 0.38 mg/l, respectively.

DISCUSSION

Antibiotic treatment of periodontal disease is empirical, as with most infectious diseases in the community, since symptoms provide no clues to help select an antibiotic. Antibiotics are used in the treatment of periodontitis when mechanical procedures have failed. If overgrowth of bacteria in plaque and the subsequent inflammatory disease are considered, a wide-spectrum antibiotic to kill as many species as possible could help in countering bacterial load. The antibiotic potency is important because the antibiotic should overcome the difficulty to control the bacterial plaque biofilm due to poor diffusion to the subgingival layer. The right choice of antimicrobial therapy, if needed, is based on the type of bacterial isolates responsible for the periodontal disease (13).

However, efficacy of antimicrobial therapy in periodontitis is based only on anecdotal reports and a few retrospective and prospective controlled and blinded studies (7). The general consensus is that appropriate antibiotic use is beneficial in the short-term and in some cases may be required to interfere with progression of periodontal attachment loss (7).

T. forsythensis and *P. gingivalis*, but not *A. actinomycetemcomitans*, have been significantly associated with attachment loss and alveolar bone loss (5). In this study, PCR detection of *T. denticola*, *P. gingivalis* and *T. forsythensis* was higher in patients with greater pocket depths (≥ 4 mm vs. < 4 mm), but only reached statistical significance in the case of *T. denticola*. Other studies have shown that these three species are the only ones that can be statistically associated to increased pocket depth and bleeding (5). *A. actinomycetemcomitans* has been reported not to be associated with adult periodontitis (5). In our study, *A. actinomycetemcomitans* was only detected by PCR in 10.4% patients.

With respect to isolates, strains of the genera *Streptococcus* and *Prevotella* were the most frequently isolated microorganisms (47.9% and 32.6%, respectively). Susceptibility is important for prophylaxis of monomicrobial systemic infections after dental procedures in a population with a periodontitis prevalence of 30% (5), since *S. viridans* bacteremia occurs in 75% of subjects with periodontal disease after odontological invasive procedures (7). In this study, all *S. viridans* isolated were susceptible to aminopenicillins, but with a moderate percentage of strains exhibiting intermediate susceptibility. High doses of amoxicillin/clavulanic acid formulations (14) provide a complete pharmacodynamic coverage of these intermediate strains. A recent report showed the efficacy of amoxicillin, but not clindamycin, in preventing bacteremia following dental extractions (15), which can be associated with adequate efficacy indices (pharmacodynamic parameters) in the serum of amoxicillin against *S. viridans* and amoxicillin-clavulanic acid against all common isolates in odontogenic infections (16).

With regard to local concentrations, mean amoxicillin concentrations (after an oral 500-mg dose) in gingival crevicular fluid of 14 mg/ml (17) are above the maximum streptococcal MIC found in this study (2 mg/ml). This is not the case for clindamycin, with around 10% of *S. viridans* resistant strains exhibiting MICs that could not be covered by the mean gingival crevicular fluid concentrations reported (2.0 mg/ml) (18). In the case of tetracycline, serum and gingival crevicular fluid (0.61 mg/ml) concentrations (19) do not cover the high percentage of intermediate and resistant strains with MICs > 2 mg/ml. As for azithromycin, the results obtained in this study suggest that

Table 1. Antimicrobial susceptibility of the 261 periodontal isolates.

Microorganism and antibiotics	MIC (mg/l)			%		
	Range	50%	90%	S	I	R
<i>Streptococcus mitis</i> (n = 44)						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-0.75	0.05	0.25	90.9	9.1	0
Amoxicillin	≤0.02-1	0.06	0.38	86.4	13.6	0
Clindamycin	≤0.02->256	0.12	32	88.6	0	11.4
Metronidazole	>256->256	>256	>256	-	-	-
Tetracycline	0.12-98	0.39	48	70.5	6.8	22.7
Azithromycin	0.03->256	0.75	64	47.7	4.5	47.7
<i>Streptococcus oralis</i> (n = 37)						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-0.64	0.06	0.25	91.9	8.1	0
Amoxicillin	0.02-0.64	0.06	0.38	86.5	13.5	0
Clindamycin	0.03->256	0.09	0.75	86.5	5.4	8.1
Metronidazole	3->256	>256	>256	-	-	-
Tetracycline	0.03-48	0.50	16	78.4	5.4	16.2
Azithromycin	≤0.02->256	3	24	67.6	2.7	29.7
<i>Streptococcus sanguis</i> (n = 11)						
Amoxicillin-clavulanic acid	0.06-2	0.38	1.50	45.5	54.5	0
Amoxicillin	0.06-2	0.25	1.50	54.5	45.5	0
Clindamycin	0.12-0.64	0.19	0.25	90.9	9.1	0
Metronidazole	>256->256	>256	>256	-	-	-
Tetracycline	0.19-12	0.38	0.50	90.9	0	9.1
Azithromycin	0.05-32	2	16	81.8	0	18.2
<i>Streptococcus</i> spp. (n = 33) ^a						
Amoxicillin-clavulanic acid	0.02-0.5	0.12	0.25	90.9	9.1	0
Amoxicillin	0.02-0.75	0.12	0.50	81.8	18.2	0
Clindamycin	≤0.02-128	0.12	0.94	78.8	12.1	9.1
Metronidazole	3->256	>256	>256	-	-	-
Tetracycline	0.02-48	0.50	6	78.8	12.1	9.1
Azithromycin	0.06->256	0.50	32	51.6	15.1	33.3
<i>Prevotella buccae</i> (n = 29)						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-0.75	0.05	0.50	100	0	0
Amoxicillin	≤0.02->256	0.06	96	82.2	0	17.1
Clindamycin	≤0.02->256	0.02	0.23	89.7	0	10.3
Metronidazole	0.02->256	0.19	2	96.6	0	3.4
Tetracycline	≤0.02-96	0.35	32	71.4	10.7	17.9
Azithromycin	≤0.02->256	1	>256	-	-	-
<i>Prevotella denticola</i> (n = 19)						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-1	0.05	1	100	0	0
Amoxicillin	≤0.02->256	1	128	63.2	10.5	26.3
Clindamycin	≤0.02->256	0.02	>256	78.9	0	21.1
Metronidazole	≤0.02-2	0.12	0.50	100	0	0
Tetracycline	0.03-96	0.50	48	61.1	16.7	22.2
Azithromycin	0.12->256	1.50	>256	-	-	-
<i>Prevotella intermedia</i> (n = 17)						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-1	0.023	0.5	100	0	0
Amoxicillin	≤0.02-192	1	128	76.5	5.9	17.6
Clindamycin	≤0.02->256	0.02	>256	88.2	0	11.8
Metronidazole	0.02->256	0.25	6	94.1	0	5.9
Tetracycline	0.02-16	1.50	12	76.5	17.6	5.9
Azithromycin	0.02->256	0.12	32	-	-	-
<i>Prevotella melaninogenica</i> (n = 11)						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-1.50	0.09	0.75	100	0	0
Amoxicillin	0.02->256	0.50	128	81.8	0	18.2
Clindamycin	≤0.02->256	0.02	0.23	90.9	0	9.1
Metronidazole	≤0.02-2	0.19	0.50	100	0	0
Tetracycline	≤0.02-32	0.50	32	63.6	0	36.4
Azithromycin	≤0.02->256	2	12	-	-	-

(Continued)

Table 1. Antimicrobial susceptibility of the 261 periodontal isolates. (Continued)

Microorganism and antibiotics	MIC (mg/l)			%		
	Range	50%	90%	S	I	R
<i>Prevotella</i> spp. (n = 9) ^b						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-0.19	0.02	0.19	100	0	0
Amoxicillin	≤0.02-8	0.25	8	88.9	11.1	0
Clindamycin	≤0.02-0.03	0.02	0.03	100	0	0
Metronidazole	≤0.02-0.50	0.09	0.50	100	0	0
Tetracycline	0.09-0.39	0.19	0.39	100	0	0
Azithromycin	0.06-6	0.75	6	-	-	-
<i>Fusobacterium nucleatum</i> (n = 18)						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-0.38	0.32	0.38	100	0	0
Amoxicillin	≤0.02-48	0.12	32	83.3	0	16.7
Clindamycin	≤0.02-0.19	0.02	0.12	100	0	0
Metronidazole	≤0.02-6	≤0.016	0.94	100	0	0
Tetracycline	≤0.02-16	0.09	1.50	94.4	0	5.6
Azithromycin	≤0.02-4	0.25	2	-	-	-
<i>Capnocytophaga</i> spp. (n = 12)						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-0.75	0.05	0.25	-	-	-
Amoxicillin	≤0.02->256	0.12	24	-	-	-
Clindamycin	≤0.02->256	≤0.016	0.38	-	-	-
Metronidazole	0.09->256	0.75	>256	-	-	-
Tetracycline	0.03-6	0.38	1	-	-	-
Azithromycin	0.25->256	1	32	-	-	-
<i>Veillonella</i> spp. (n = 10)						
Amoxicillin-clavulanic acid	0.03-4	0.50	2	100	0	0
Amoxicillin	0.03-8	0.75	3	90	10	0
Clindamycin	0.02-1.5	0.12	0.50	100	0	0
Metronidazole	0.25-12	3	8	90	10	0
Tetracycline	0.03-1	0.39	0.75	100	0	0
Azithromycin	1-64	4	24	-	-	-
Others (n = 11) ^c						
Amoxicillin-clavulanic acid	≤0.02-0.38	0.06	0.25	-	-	-
Amoxicillin	≤0.02-0.50	0.12	0.38	-	-	-
Clindamycin	≤0.02->256	0.250	>256	-	-	-
Metronidazole	≤0.02->256	>256	>256	-	-	-
Tetracycline	0.19-256	1	24	-	-	-
Azithromycin	≤0.02->256	0.19	>256	-	-	-

S: susceptible; I: intermediate; R: resistant. ^aIncludes *S. gordonii* (n = 8); *S. salivaris* (n = 7); *S. constellatus* (n = 6); *S. anginosus* (n = 5); *S. parasanguis* (n = 3); *S. intermedius* (n = 2); and *S. vestibularis* (n = 2). ^bIncludes *P. oralis* (n = 8) and *P. loescheii* (n = 1). ^cIncludes *Gemella morbillorum* (n = 4); *Actinomyces* spp. (n = 2); *Actinomyces megei* (n = 1); *Bacteroides ovatus* (n = 1); *Bacteroides stercoris* (n = 1); *Cardiobacterium hominis* (n = 1); and *Eikenella corrodens* (n = 1).

it is inadequate due to high rates of resistance ($MIC_{90} \geq 16$ mg/l). In Spain, high resistance to macrolides (20) is commonly associated with high resistance to tetracycline (21), clindamycin and azalides such as azithromycin in *S. viridans* (22).

With respect to *Prevotella*, 100% isolates were susceptible to amoxicillin-clavulanic acid, with resistance rates of the prevalent species (*P. buccae*, *P. denticola* and *P. intermedia*) ranging from 9.1% to 21% for clindamycin, from 0% to 5.9% for metronidazole, and from 5.9% to 36.4% for tetracycline. Mean gingival crevicular fluid concentrations

of amoxicillin-clavulanic acid (14 mg/l for amoxicillin and 0.40 mg/l for clavulanic acid) (17) exceed the MIC determined against all isolates, while mean gingival crevicular fluid concentrations of other compounds do not cover the resistant strains, nor, in the case of clindamycin, a number of susceptible strains. As for metronidazole, the drug showing the lowest resistance rates excluding amoxicillin-clavulanic acid, mean concentrations (36.7 mg/l) (23) do not cover the MIC determined in two cases.

This study shows that amoxicillin-clavulanic acid is the most active antibiotic against all species tested, followed

by metronidazole in the case of anaerobes. No resistant strains to amoxicillin-clavulanic acid were found among all the isolates from this cohort of patients with periodontitis.

When considering isolates from patients with periodontal disease, three types of bacteria should be considered: i) periodontopathogens, such as *T. denticola* and other noncultivable spirochete that are penicillin-susceptible, the prevalence of which increase in line with severity (greater gingival pocket depth), as a basis for considering periodontitis an infectious disease; ii) bacteria responsible for the nonspecific bacterial growth and the subsequent inflammatory disease, with *Prevotella* spp. being the most prevalent anaerobe isolate; and iii) isolates of oral microbiota that are also responsible for increased bacteremia after dental manipulation in patients with periodontitis: group viridans streptococci, mainly *S. mitis* and *S. oralis*. When an antibiotic is needed it would be desirable to obtain coverage of these three types of direct or indirect pathogens.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank E. Valero and J.E. Martín for their critical review of the manuscript.

This study was supported in part by an unrestricted grant from GlaxoSmithKline S. A., Tres Cantos, Madrid, Spain.

Correspondence: Lorenzo Aguilar, Department of Microbiology, School of Medicine, Universidad Complutense, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 3941511; Fax: +34 91 3941511; e-mail: laguilar@med.ucm.es

REFERENCES

- Chhour, K.L., Nadkarni, M.A., Byun, R. et al. *Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries*. J Clin Microbiol 2005; 43: 843-849.
- Adriaens, P.A., Edwards, C.A., De Boever, J.A., Loesche, W.J. *Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth*. J Periodontol 1988; 59: 493-503.
- McFall, W.T., Jr. *Tooth loss in 100 treated patients with periodontal disease. A long-term study*. J Periodontol 1982; 53: 539-549.
- Meador, H.L., Lane, J.J., Suddick, R.P. *The long-term effectiveness of periodontal therapy in a clinical practice*. J Periodontol 1985; 56: 253-258.
- Loesche, W.J., Grossman, N.S. *Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: Diagnosis and treatment*. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 727-752.
- Sixou, J.L., Magaud, C., Jolivet-Gougeon, A., Cormier, M., Bonnaure-Mallet, M. *Evaluation of the mandibular third molar pericoronitis flora and its susceptibility to different antibiotics prescribed in France*. J Clin Microbiol 2003; 41: 5794-5797.
- Fine, D.H., Hammond, B.F., Loesche, W.J. *Clinical use of antibiotics in dental practice*. Int J Antimicrob Agents 1998; 9: 235-238.
- Barbari, E.F., Cockerill, 3rd, F.R., Steckelberg, J.M. *Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms*. Mayo Clin Proc 1997; 72: 532-542.
- Rajasuo, A., Perkki, K., Nyfors, S., Jousimies-Somer, H., Meurman, J.H. *Bacteremia following surgical dental extraction with an emphasis on anaerobic strains*. J Dent Res 2004; 83: 170-174.
- García-Rey, C., Fenoll, A., Aguilar, L., Casal, J. *Effect of social and climatological factors on antimicrobial use and Streptococcus pneumoniae resistance in different provinces in Spain*. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 465-471.
- Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement*. CLSI/NCCLS document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2005.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard-Fifth edition, Document M11-A5*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2001.
- Loesche, W.J. *The antimicrobial treatment of periodontal disease: Changing the treatment paradigm*. Crit Rev Oral Biol Med 1999; 10: 245-275.
- Kaye, C.M., Allen, A., Perry, S. et al. *The clinical pharmacokinetics of a new pharmacokinetically enhanced formulation of amoxicillin/clavulanate*. Clin Ther 2001; 23: 578-584.
- Diz Dios, P., Tomás Carmona, I., Limeres Posse, J. et al. *Comparative efficacies of amoxicillin, clindamycin and moxifloxacin in prevention of bacteremia following dental extractions*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2996-3002.
- Isla, A., Canut, A., Gascon, A.R. et al. *Pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of antimicrobial treatments of orofacial odontogenic infections*. Clin Pharmacokinet 2005; 44: 305-316.
- Tenenbaum, H., Jehl, F., Gallion, C., Dahan, M. *Amoxicillin and clavulanic acid concentrations in gingival crevicular fluid*. J Clin Periodontol 1997; 24: 804-807.
- Walker, C.B., Gordon, J.M., Cornwall, H.A., Murphy, J.C., Socransky, S.S. *Gingival crevicular fluid levels of clindamycin compared with its minimal inhibitory concentrations for periodontal bacteria*. Antimicrob Agents Chemother 1981; 19: 867-871.
- Sakellari, D., Goodson, J.M., Kolokotronis, A., Konstantinidis, A. *Concentration of 3 tetracyclines in plasma, gingival crevice fluid and saliva*. J Clin Periodontol 2000; 27: 53-60.
- Rodríguez-Avial, I., Rodríguez-Avial, C., Culebras, E., Picazo, J.J. *In vitro activity of telithromycin against viridans group streptococci and Streptococcus bovis isolated from blood: Antimicrobial susceptibility patterns in different groups of species*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 820-823.
- Rodríguez-Avial, I., Rodríguez-Avial, C., Culebras, E., Picazo, J.J. *Distribution of tetracycline resistance genes tet(M), tet(O), tet(L) and tet(K) in blood isolates of viridans group streptococci harbouring erm(B) and mef(A) genes. Susceptibility to quinupristin/dalfopristin and linezolid*. Int J Antimicrob Agents 2003; 21: 536-541.
- Tomás, I., Limeres, J., Diz, P. *Antibiotic prophylaxis*. Br Dent J 2005; 198: 60-61.
- Poulet, P.P., Duffaut, D., Barthet, P., Brumpt, I. *Concentrations and in vivo antibacterial activity of spiramycin and metronidazole in patients with periodontitis treated with high-dose metronidazole and the spiramycin/metronidazole combination*. J Antimicrob Chemother 2005; 55: 347-351.