



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes

Renata Martins do Souto

**PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS “NÃO-
ORAIS” EM AMOSTRAS DE BIOFILME SUBGENGIVAL E
SALIVA DE PACIENTES COM PERIODONTITE OU SAÚDE
PERIODONTAL**

Tese de doutorado

Rio de Janeiro

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



Universidade Federal do Rio de Janeiro

Renata Martins do Souto

**PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS “NÃO-ORAIS”
EM AMOSTRAS DE BIOFILME SUBGENGIVAL E SALIVA DE
PACIENTES COM PERIODONTITE OU SAÚDE PERIODONTAL**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia Médica), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientadora: Dr^a Ana Paula Vieira Colombo

Rio de Janeiro

2007

Ficha Catalográfica

Do Souto, Renata Martins.

Prevalência de bactérias patogênicas “não-orais” em amostras de biofilme subgengival e saliva de pacientes com periodontite ou saúde periodontal/ Renata Martins do Souto - Rio de Janeiro: UFRJ/IMPPG, 2007.

xx, 155f: il.; 29,7 cm.

Orientadora: Ana Paula Vieira Colombo

Tese (Doutorado) – UFRJ / Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes / Programa de Pós-graduação em Ciências (Microbiologia), 2007.

Referências bibliográficas: f.87- 110.

1. Periodontite. 2. Bactérias patogênicas. 3. Checkerboard. 4. PCR. 5. Saliva. 6. Biofilme subgengival. I. Colombo, Ana Paula Vieira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes. III. Título.

Renata Martins do Souto

PREVALÊNCIA DE BACTÉRIAS PATOGÊNICAS “EXTRA-ORAIS” EM AMOSTRAS DE BIOFILME SUBGENGIVAL E SALIVA DE PACIENTES COM PERIODONTITE OU SAÚDE PERIODONTAL.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ana Paula Vieira Colombo

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Microbiologia Médica.

Rio de Janeiro, _____ de julho de 2007.

Aprovada por:

Ana Paula Vieira Colombo – Doutora (Membro/Orientadora)
Prof^a Adjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes

Sérgio Eduardo Lonho Fracalanza – Doutor (Presidente da Banca)
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes – Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Ângela Christina Dias de Castro – Doutora (Membro/Revisora)
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro/
UFRJ.

Lúcio de Souza Gonçalves – Doutor (Membro)
Faculdade de Ciências Médicas – Pesquisador associado FAPERJ do Instituto de
Microbiologia Prof. Paulo de Góes.

Milton de Uzeda – Doutor (Membro)
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Trabalho realizado no Departamento de Microbiologia Médica, Laboratório de Microbiologia Oral do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ, sob a orientação da Prof^a Ana Paula Vieira Colombo.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Carlos e Sheila, que durante toda a minha vida foram exemplo de força, luta, garra e união. Com um toque de exigência e muita segurança, estão permitindo que todos os meus sonhos se tornem realidade.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Vieira Colombo pela confiança depositada desde o início. Pela oportunidade contínua de me desenvolver e aprimorar em todos os assuntos, principalmente, a microbiologia. Pela paciência nos momentos de confusão. Seu entusiasmo é uma característica marcante, assim como seu apoio e incentivo. Muito obrigada por tudo!!!!!!!!!!!!!!!

Ao Prof. Dr. Milton de Uzeda, por estar sempre disposto a ajudar no que for preciso. Pelo apoio ao trabalho e por estar sempre por perto. Por ter participado de mais uma etapa do meu desenvolvimento científico.

Ao Ronald, que de forma compreensiva respeitou todos os meus limites, desejos e meu cansaço.

À companheira de laboratório Carina Maciel, que tornou os momentos científicos ainda mais agradáveis, com sua inteligência e companheirismo. Por toda a ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho, principalmente nos assuntos voltados à Odontologia.

Aos companheiros, Lucio Gonçalves e Andréa Colombo, amigos essenciais com quem sempre pude contar todas as vezes que precisei, comemorando comigo cada vitória conquistada.

Aos companheiros, Natascha Giovannetti, Rodrigo Carvalho, David Zuanazzi, pela amizade e por todos os conhecimentos compartilhados.

Ao técnico Fernando Magalhães, por toda a ajuda e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Marley Gomes da Silva, sempre disposto a ajudar e a resolver qualquer dificuldade do trabalho.

À amiga Ivi Cristina, grande companheira de trabalho e que me ajudou muito durante momentos de dúvida. Uma excelente pessoa capaz de ajudar a todos sempre que é solicitada. O Departamento de Microbiologia Médica tem muita sorte de ter uma pessoa como você por perto.

Às amigas de turma da graduação, Marta Gomes, Daniele, Renata Barreto pelos momentos de descontração e pelo companheirismo. A amizade de vocês é muito importante para mim.

Aos professores do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, por todo o conhecimento que me foi passado desde a graduação. Muito obrigada pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Às agências financiadoras do projeto: CNPq, PRONEX e FAPERJ.

À agência financiadora da minha bolsa de estudos: CNPq.

A todos aqueles que me apoiaram de alguma forma e que acreditam que apenas com lealdade e amizade conseguimos alcançar nossos ideais.



Só é útil o conhecimento que nos torna melhores.

Sócrates

RESUMO

DO SOUTO, Renata Martins. Prevalência de bactérias patogênicas “não-orais” em amostras de biofilme subgengival e saliva de pacientes com periodontite ou saúde periodontal. Rio de Janeiro, 2007. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) – Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Apesar da extensa literatura sobre a associação de bactérias e infecções orais com doenças sistêmicas, pouco é sabido sobre o papel da cavidade oral como um reservatório de bactérias patogênicas. O objetivo do presente estudo foi determinar a prevalência de bactérias patogênicas de importância médica como: *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* na cavidade oral de pacientes com periodontite ou saúde periodontal, utilizando as técnicas do “Checkerboard DNA-DNA hybridization”, PCR e cultura. Amostras de saliva e/ou biofilme subgengival foram obtidas de indivíduos com saúde periodontal e de pacientes com periodontite. A prevalência (% de sítios colonizados) e os níveis (número de células bacterianas) de cada espécie bacteriana foram computados para cada sítio, paciente e dentro de cada grupo. Diferenças clínicas e microbiológicas entre os grupos foram avaliadas através dos testes de Mann-Whitney, Qui-quadrado e exato de Fischer. A espécie que predominou nas amostras analisadas pelo checkerboard foi *E. faecalis* (29,3%). A espécie bacteriana encontrada em maior nível foi *P. aeruginosa* ($3,15 \times 10^4$ células). Indivíduos com periodontite apresentaram % e níveis significativamente mais elevados de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis* e *S. aureus* em relação ao grupo controle. Pela análise de PCR, a espécie bacteriana mais prevalente em todas as amostras avaliadas de todos os indivíduos foi a *P. aeruginosa* (32%). As espécies *H. pylori* e *E. faecalis* foram detectadas em 23,4% e 30% do total de amostras, respectivamente. Todas as 3 espécies avaliadas foram detectadas em maior frequência nas amostras de indivíduos com periodontite ($p < 0,01$). As mais prevalentes no biofilme subgengival foram *P. aeruginosa* ($52.2 \pm 50\%$) e *H. pylori* ($50 \pm 46\%$), e na saliva foram mais prevalentes *P. aeruginosa* (49.7%) e *E. faecalis* (40.5%). Sinais clínicos de doença periodontal tais como: PBS, NCI, SAS e BS apresentaram uma correlação positiva com todas as espécies analisadas. Para a detecção de espécies de *Staphylococcus*, a metodologia de cultura foi utilizada. A grande maioria dos isolados dos pacientes estudados tanto no grupo de pacientes com periodontite como no grupo controle foi *S. epidermidis* (75% e 69,2%, respectivamente). A espécie *S. aureus* foi detectada em 20,8% das amostras bacterianas isoladas de pacientes com periodontite e em 7,7% dos pacientes com saúde periodontal. Não houve diferença estatisticamente significativa para essas duas espécies entre os dois grupos. Das espécies isoladas de *S. aureus*, 20% carregavam o gene *mecA*, enquanto 11,1% dos isolados de *S. epidermidis* carregavam o gene *mecA*. Bactérias patogênicas “não-orais” são detectadas em grande prevalência em biofilme subgengival e saliva de pacientes com periodontite, o que sugere que a doença periodontal pode favorecer a colonização por essas espécies. Mais atenção deve ser dada a esses pacientes com relação à prevenção do desenvolvimento de infecções em outros sítios do organismo.

Palavras-chave: Bactérias patogênicas, periodontite, checkerboard, PCR, saliva e biofilme subgengival

ABSTRACT

DO SOUTO, Renata Martins. Prevalence of non-oral pathogenic bacteria in subgingival and saliva of patients with periodontitis or periodontal health. Rio de Janeiro, 2007. Thesis (Doctor in Sciences - Microbiology) – Institute of Microbiology Prof. Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

The oral cavity may act as a reservoir for several pathogens related to systemic infections. Therefore, the purpose of this study was to determine the prevalence and levels of pathogenic bacteria including *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* in the oral cavity of periodontitis or periodontally healthy subjects using the techniques of checkerboard DNA-DNA hybridization, PCR and culture. Saliva and subgingival biofilm were obtained from periodontally healthy and periodontitis patients. The prevalence (% of sites colonized) and levels (counts) of each species were computed for each site, patient and group. Significance of differences in clinical and microbiological parameters among groups were examined using the Mann-Whitney, χ^2 and Fischer's exact tests. The predominant species in all samples by the checkerboard technique was *E. faecalis* (29.3%). The species detected in the highest level was *P. aeruginosa* (3.15×10^4 cells). Periodontitis patients presented significantly higher prevalence and levels of *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis* and *S. aureus* than periodontally health subjects. Using the PCR technique, the most prevalent species in all samples analysed was *P. aeruginosa* (32%). The species *H. pylori* and *E. faecalis* were detected in 23.4% and 30%, respectively. All 3 species were detected in greater frequency in the samples from patients with periodontitis ($p < 0.01$). The most frequent species in subgingival biofilms were *P. aeruginosa* ($52.2 \pm 50\%$) and *H. pylori* ($50 \pm 46\%$), and in saliva samples were *P. aeruginosa* (49.7%) and *E. faecalis* (40.5%). Clinical signs of disease such as PD, BOP, CAL and SB presented a positive correlation with all the species. For detection of *Staphylococcus* species, culture was used. The majority of the isolates recovered in both, periodontitis and periodontal health groups, were *S. epidermidis* (75% and 69,2%, respectively). *S. aureus* was detected in 20.8% of the isolates from patients with periodontitis and in 7,7% from healthy individuals. No significant differences between groups were found for these species. From the total of *S. aureus* isolated, 20% carried the *mecA* gene, whereas 11.1% of *S. epidermidis* isolates carried the *mecA* gene. All the species were detected in greater prevalence in subgingival biofilm and saliva of patients with periodontitis in comparison to the periodontally healthy group. In conclusion, "non-oral" pathogenic bacteria are detected in high prevalence and levels in subgingival biofilm and saliva of periodontitis patients, suggesting that periodontal infection may favor the colonization by this species. Close attention should be given to these patients regarding the risk for development of infection in other sites of the body.

Key-words: "Non-oral" pathogenic bacteria, periodontitis, checkerboard, PCR, saliva and subgingival biofilm.

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	14
LISTA DE TABELAS	16
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	18
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. Ecologia da cavidade oral	21
1.2. Infecção oral focal	22
1.3. Relação da doença periodontal e doenças sistêmicas	23
1.4. Doenças sistêmicas associadas com infecções orais	25
1.5. Transmissão e disseminação de patógenos da cavidade oral	28
1.6. Cavidade oral: reservatório de bactérias patogênicas?	29
2. OBJETIVOS	35
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1. Seleção dos indivíduos	37
3.2. Exame clínico periodontal	38
3.3. Coleta das amostras de biofilme subgengival e saliva	38
3.4. Identificação das espécies bacterianas através do checkerboard	39
3.5. Identificação das espécies bacterianas através do PCR	41
3.5.1. <i>Extração de DNA das amostras de biofilme e saliva</i>	41
3.5.2. <i>Detecção da espécie H. pylori</i>	42
3.5.3. <i>Detecção da espécie E. faecalis</i>	42

3.5.4. <i>Detecção da espécie P. aeruginosa</i>	43
3.5.5. <i>Detecção de DNA bacteriano</i>	44
3.6. Identificação e caracterização fenotípica de <i>Staphylococcus</i>	44
3.7. Identificação genotípica das espécies de <i>Staphylococcus</i> e a presença do gene <i>mecA</i>	45
3.8. Análise Estatística	47
4. RESULTADOS	48
4.1. Resultados clínicos	48
4.2. Resultados microbiológicos	48
4.2.1. <i>Detecção das espécies bacterianas por checkerboard</i>	48
4.2.2. <i>Detecção das espécies bacterianas H. pylori, E. faecalis e P. aeruginosa por PCR</i>	49
4.2.3. <i>Detecção das espécies S. aureus e S. epidermidis e a presença do gene mecA</i>	50
5. DISCUSSÃO	73
6. CONCLUSÕES	86
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
8. ANEXOS	111
Anexo 1. Termo de consentimento livre e esclarecido	112
Anexo 2. Protocolo da Comissão de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga – UFRJ	113
Anexo 3. Questionário de saúde	114
Anexo 4. Publicações científicas – Artigo 1	116
Anexo 5. Publicações científicas – Artigo 2	135

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC – American type culture collection

BP – bolsa periodontal

BS – biofilme supragengival

CfA – fator clumping A (do inglês: Clumping factor A)

CTAB – Hexadecyltrimethylammonium bromide

DMSO- dimethyl sulfoxide

DNA – ácido desoxirribonucleico

E – esmalte dentário

ECF – enhanced chemifluorescence

EDTA- ácido etileno diamino tetracético

EJ – epitélio juncional

HC - home care

HIV - vírus da imunodeficiência humana

JCE – junção cimento-esmalte

LPS - lipopolissacarídeo

M – molar

MRSA- *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

MRSE- *Staphylococcus epidermidis* resistentes à meticilina

mg – miligramas

ng - nanogramas

mL - mililitro

mM – milimolar

µL – microlitro

pM – picomolar

pmol - picomol

pb- pares de base

PBS – profundidade de bolsa à sondagem

PCR – reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial de hidrogênio

RNA – ácido ribonucléico

rRNA – ácido ribonucléico ribossomal

SAS – sangramento à sondagem

SDS – dodecil sulfato de sódio

SPPS – Statistical Package for the Social Sciences

SSC – solução tampão de sódio-citrato

SUP – supuração

TCI – tecido conectivo inflamado

TE – tampão de tris-HCl e EDTA

TSB – caldo de soja triptona

U - unidades

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

16S – subunidade 16 do ribossomo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Possíveis mecanismos que correlacionam presença de microrganismos na cavidade oral e doenças sistêmicas (THODEN VAN VELZEN, ABRAHAN-INJIPIN & MOORER, 1984; OVERHOLSER, MOREILLON & GLAUSER, 1987; OKUDA & EBIHARA 1998).	52
Tabela 2. Relação das espécies de bactérias selecionadas para a confecção das sondas genômicas e emprego nos ensaios de hibridização pelo método do checkerboard.	53
Tabela 3. Seqüência dos iniciadores para detecção de <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> e o gene <i>mecA</i> segundo Mason <i>et al.</i> , 2001.	54
Tabela 4. Parâmetros clínicos periodontais e demográficos dos indivíduos com periodontite ou saúde periodontal da população analisada pelo método do checkerboard.	55
Tabela 5. Parâmetros clínicos periodontais e demográficos dos indivíduos com periodontite ou saúde periodontal da população analisada pelo PCR.	56
Tabela 6. Parâmetros clínicos periodontais e demográficos dos indivíduos com periodontite ou saúde periodontal da população	57

estudada para isolamento de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

Tabela 7. Correlação entre parâmetros clínicos periodontais e prevalência das espécies bacterianas da população analisada pelo PCR.

58

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

-
- Figura 1.** Anatomia do periodonto. (A)- Esquema de um periodonto com saúde periodontal. E, esmalte dentário. (B) Figura esquemática de uma lesão periodontal com a formação da bolsa periodontal. JCE, junção cimento-esmalte; TCI, tecido conectivo inflamado; EJ, epitélio juncional. Adaptado de LINDHE, 1999. 59
- Figura 2A.** Esquema do aparato “Minislot 30”. 60
- Figura 2B.** Esquema do aparato “Miniblotter 45” e hibridização com as sondas de DNA. 61
- Figura 3.** Padrão de hibridização da sondas de DNA com as amostras de biofilme subgengival de pacientes em forma de tabuleiro de xadrez. As duas últimas linhas horizontais são compostas pelos controles de 10^5 e 10^6 células bacterianas. 62
- Figura 4.** Foto do gel contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para *H. pylori*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo com DNA de *H. pylori* ATCC 43629; 3- amostra de saliva positiva para *H. pylori*; 4- amostra de saliva negativa para *H. pylori*; 5- a mesma amostra de saliva negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 6- amostra de biofilme subgengival positiva para *H. pylori*; 7- amostra de biofilme subgengival negativa para *H. pylori*; 8- a mesma amostra de biofilme subgengival negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 9- controle negativo. 63
- Figura 5.** Foto do gel contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para *E. faecalis*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo com DNA de *E. faecalis* ATCC 64

29212; 3- amostra de saliva positiva para *E. faecalis*; 4- amostra de saliva negativa para *E. faecalis*; 5- a mesma amostra de saliva negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 6- amostra de biofilme subgengival positiva para *E. faecalis*; 7- amostra de biofilme subgengival negativa para *E. faecalis*; 8- a mesma amostra de biofilme subgengival negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 9- controle negativo.

Figura 6. Foto do gel contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para *P. aeruginosa*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo com DNA de *P. aeruginosa* ATCC 27853; 3- amostra de saliva positiva para *P. aeruginosa*; 4- amostra de saliva negativa para *P. aeruginosa*; 5- a mesma amostra de saliva negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 6- amostra de biofilme subgengival positiva para *P. aeruginosa*; 7- amostra de biofilme subgengival negativa para *P. aeruginosa*; 8- a mesma amostra de biofilme subgengival negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 9- controle negativo.

65

Figura 7. Foto do gel contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para as espécies de *Staphylococcus* e o gene *mec A*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo com DNA de *S. epidermidis* ATCC 14579; 3- controle positivo com DNA de MRSA USA 100; 4- controle positivo com DNA de MRSE HC 687; 5- amostra de biofilme subgengival positiva para *S. epidermidis*; 6- amostra de biofilme subgengival positiva para MRSA; 7- amostra de biofilme subgengival positiva para MRSE; 8- amostra de biofilme subgengival positiva somente para o 16S bacteriano; 9- controle negativo.

66

Figura 8. Prevalência das espécies bacterianas no biofilme subgengival dos diferentes grupos clínicos avaliados pelo método do checkerboard. * Refere-se ao teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

67

- Figura 9.** Níveis médios das espécies bacterianas no biofilme subgengival dos diferentes grupos clínicos avaliados pelo método do checkerboard. * Refere-se ao teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$). 68
- Figura 10.** Frequência média de detecção das espécies *H. pylori*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em amostras de biofilme subgengival de indivíduos saudáveis ($n=56$) e de pacientes com periodontite ($n = 169$) através de PCR. * Refere-se ao teste de Mann-Whitney ($p < 0,001$). 69
- Figura 11.** Frequência de detecção das espécies *H. pylori*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em amostras de saliva de indivíduos saudáveis ($n=56$) e de pacientes com periodontite ($n = 169$) através de PCR.* Refere-se ao teste exato de Fisher ($p < 0,001$). 70
- Figura 12.** Frequência de detecção de *S. aureus* e *S. epidermidis* nos isolados de indivíduos saudáveis ($n=13$) e de pacientes com periodontite ($n = 25$). 71
- Figura 13.** Frequência de detecção de *S. aureus* (MRSA) e *S. epidermidis* (MRSE) carreadores do gene *mecA* entre as amostras bacterianas isoladas de indivíduos com periodontite e saúde periodontal. 72

1. INTRODUÇÃO

1.1. Ecologia da Cavidade Oral

A cavidade oral humana é colonizada por uma grande variedade de microorganismos. Cerca de mais de 700 espécies de bactérias podem ser detectadas ou isoladas do biofilme dental, mucosa oral e saliva (PASTER, BARTOSZYK & DEWHRIST, 1998; PASTER, BOCHES & GALVIN, 2001). Dessas, cerca de 400 espécies representam microorganismos desconhecidos ainda não cultiváveis (PASTER, OLSEN & DEWHIRST, 2006).

O ambiente oral apresenta condições variáveis de tensão de oxigênio, disponibilidade de nutrientes e de estruturas anatômicas que se apresentam tanto com o aspecto amolecido das mucosas como com a consistência rígida dos dentes (MORRIS, 1979). Essa grande diversidade de determinantes ecológicos leva a condições favoráveis às exigências nutritivas, respiratórias e de aderência necessárias à colonização de um grande número de microorganismos nesse ecossistema. As diferentes áreas da cavidade oral humana permitem a instalação de verdadeiros habitats ecológicos microbianos na mucosa da bochecha, no dorso da língua, sulco gengival e superfície coronária dos dentes (MAGER *et al.*, 2003). A mucosa da bochecha favorece a implantação de microorganismos predominantemente anaeróbios facultativos. O sulco gengival, onde há baixa tensão de oxigênio e a presença de um exsudato rico em substâncias nutritivas provenientes do fluido gengival, revela-se como ambiente ideal para populações de microorganismos principalmente anaeróbios estritos e proteolíticos. Outrossim, a superfície das coroas dentárias, constantemente expostas à saliva e dieta do hospedeiro, apresenta condições ecológicas que, inicialmente, favorecem a colonização de

bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas e, posteriormente, de algumas espécies de bactérias anaeróbias estritas, bem como espécies sacarolíticas (BOWDEN, ELWOOD & HAMILTON, 1979).

Os microorganismos freqüentemente encontrados na cavidade oral apresentam grande potencial patogênico, podendo estar em antibiose ou simbiose com o hospedeiro humano, caracterizando, através desse comportamento, uma relação de anfibiose (ROSEBURY, 1966). Essa microbiota anfibiótica é responsável pela natureza endógena das infecções orais (ROSEBURY, 1966). Além disso, essas espécies também podem causar infecções em outros sítios anatômicos em determinadas situações. Por exemplo, espécies de estreptococos orais convivem normalmente em equilíbrio com o hospedeiro. No entanto, em alguns indivíduos esses microorganismos também podem colonizar válvulas cardíacas através da sua disseminação pela corrente sangüínea, levando à endocardite bacteriana (DESHPANDE, KHAN & GENCO, 1998).

1.2. Infecção Oral Focal

Um grande número de estudos epidemiológicos tem sugerido que a infecção oral, especialmente a doença periodontal, pode ser um fator de risco para doenças sistêmicas, tais como as doenças cardiovasculares e respiratórias (LI *et al.*, 2000).

A teoria da infecção focal, sustentada durante os séculos 19 e 20, definia que o foco de uma sepse era responsável pelo início e progressão de uma variedade de doenças inflamatórias como a artrite, úlcera péptica e apendicite (SCANNAPIECO, 1998). O recente progresso na classificação e identificação da microbiota associada a doenças orais distintas tem reaberto caminhos para o reconhecimento da importância da infecção oral focal (LI *et al.*, 2000). Tem se tornado cada vez mais claro que a cavidade oral pode atuar como um reservatório para a disseminação de microorganismos patogênicos para sítios distantes do

organismo, especialmente em hospedeiros imunocomprometidos, como pacientes diabéticos, pacientes com artrite reumatóide, infectados pelo HIV ou sendo submetidos a tratamento imunossupressor. Além disso, os microorganismos que colonizam a cavidade oral formam biofilmes específicos, os quais não só podem abrigar diversas espécies patogênicas, como também conferem a essas e outras espécies não patogênicas uma maior resistência aos antimicrobianos (COSTERTON *et al.*, 1995).

1.3. Relação da Doença Periodontal e Doenças Sistêmicas

Doenças periodontais são infecções de origem bacteriana que induzem uma resposta inflamatória no hospedeiro, levando eventualmente à destruição do periodonto e perda dentária (LOE *et al.*, 1986; LINDHE *et al.*, 1989; ALBANDAR, 1990; PAGE *et al.*, 2000). O termo doença periodontal descreve uma diversidade de entidades clínicas distintas que afetam o periodonto, incluindo a gengiva, a inserção conjuntiva, o ligamento periodontal, o cimento radicular e o osso alveolar de suporte (Figura 1A) (página 38) (ARMITAGE, 1999). A periodontite ocorre pela extensão da inflamação no interior de estruturas mais profundas do periodonto, e suas características clínicas usuais são: formação de bolsa periodontal, perda óssea e mobilidade dentária (Figura 1B) (página 38). A bolsa periodontal é um sulco gengival aprofundado patologicamente e ocorre pela migração apical do epitélio juncional ao longo da raiz dentária (PAGE *et al.*, 2000). As bolsas profundas causadas pelo processo infeccioso da doença periodontal podem servir de reservatório não só para bactérias periodontopatogênicas, mas também para bactérias não-orais patogênicas que podem, eventualmente, colonizar a cavidade oral. A proximidade anatômica da microbiota presente na bolsa periodontal com a microcirculação sangüínea gengival pode facilitar a bacteremia e a disseminação sistêmica de espécies bacterianas e seus produtos, bem como imunocomplexos para outros órgãos do organismo (LI *et al.*, 2000).

Estudos microbiológicos das infecções periodontais têm demonstrado que um pequeno subgrupo de microorganismos do biofilme dental supra e subgingival está associado à etiologia dessas doenças (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Nas diversas formas de infecções periodontais, a composição da microbiota subgingival pode variar com a profundidade da bolsa e com a gravidade da doença, bem como entre indivíduos ou mesmo entre sítios periodontais num mesmo indivíduo (HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994). Dentre as principais espécies consideradas como patógenos periodontais destacam-se *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (anteriormente denominado *Actinobacillus actinomycetemcomitans*) (SLOTS & RAMS, 1992; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1992; ASIKAINEN & ALALUUSUA, 1993; HAFFAJEE & SOCRANSKY, 1994; MOORE & MOORE, 1994; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2005). Outras evidências têm sugerido que as periodontites podem representar infecções mistas causadas por grupos específicos de microorganismos (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Mais recentemente, estudos utilizando técnicas moleculares têm associado diversos outros microorganismos a uma possível etiologia para diferentes formas de doença periodontal (KUMAR *et al.*, 2003). Entre estes, destacam-se espécies da microbiota intestinal, meio ambiente, espécies associadas a infecções hospitalares, e até mesmo alguns vírus (CONTRERAS, NOWZARI & SLOTS, 2000). Entretanto, o verdadeiro papel desses microorganismos na patogenia das infecções periodontais, bem como as inter-relações dessas espécies com membros residentes da microbiota oral normal não estão determinados. Por outro lado, infecções periodontais também podem aumentar a suscetibilidade de um indivíduo a outras doenças. Page (1988) propôs que a doença periodontal pode afetar a susceptibilidade do hospedeiro a doenças sistêmicas de três maneiras: através de fatores de risco relacionados, através do biofilme

subgingival que funciona como reservatório de bactérias Gram-negativas (e até de outras espécies patogênicas não-orais), e da presença de mediadores inflamatórios no local da infecção.

1.4. Doenças Sistêmicas Associadas com Infecções Oraís

A endocardite infecciosa é uma infecção bacteriana das válvulas ou do endotélio do coração que ocorre devido ao alojamento de bactérias circulantes da corrente sanguínea nas válvulas cardíacas. É uma condição sistêmica séria e, às vezes fatal, que durante décadas tem sido associada a doenças orais e procedimentos dentários (LACASSIN *et al.*, 1995; DRANGSHOLT, 1998). Vários outros trabalhos utilizando modelos animais mostraram histologicamente que bactérias orais provenientes de procedimentos de extração dentária podem levar à endocardite sob condições experimentais (DURACK, BEESON & PETERSDORF, 1973; OVERHOLSER, MIREILLON & GLAUSER, 1987). Drangsholt (1998) relatou que 8% de todos os casos de endocardite infecciosa estão associados com doenças orais, principalmente com a doença periodontal. De todos os casos de endocardite infecciosa, mais de 80% são adquiridos na comunidade, sendo o microorganismo associado normalmente a um membro da microbiota indígena do hospedeiro. Este mesmo autor propôs um novo modelo de associação das doenças orais com a endocardite infecciosa, o qual envolve a bacteremia persistente de longa duração e a bacteremia de curta duração. A bacteremia persistente originada a partir da placa dental, doenças orais ou procedimentos dentários provocaria um dano inicial na superfície endotelial das válvulas cardíacas, o que promoveria um espessamento dessas válvulas, facilitando a aderência e colonização bacteriana, resultando em uma infecção fulminante.

Apesar da endocardite ser uma das infecções sistêmicas relacionadas à microbiota oral mais extensivamente estudada, muitas outras desordens têm sido associadas às doenças orais. Doenças cardiovasculares, tais como arteroesclerose e infarto do miocárdio, ocorrem como o

resultado da presença de fatores genéticos e/ou fatores ambientais, tais como idade, obesidade, hipertensão, diabetes, *status* socio-econômico, estresse, dieta, atividade física e fumo (HERZBERG & MEYER, 1996; 1998). Ademais, evidências têm suportado uma associação entre infecção crônica e inflamação com doença cardiovascular (RIDCKER *et al.*, 1997). Dessa forma, a doença periodontal pode predispor indivíduos a doenças cardiovasculares devido à abundância de bactérias Gram-negativas envolvidas na sua etiologia, ao elevado nível de citocinas pró-inflamatórias, à resposta imune exacerbada e ao infiltrado inflamatório persistente (SEYMOUR *et al.*, 2003). Existem vários mecanismos propostos pelos quais a doença periodontal pode levar à doença cardiovascular, incluindo efeitos diretos e indiretos das bactérias orais. Evidências indicam que bactérias orais, como o *Streptococcus sanguinis* (que é uma das espécies microbianas mais prevalentes no biofilme dental e a mais freqüentemente associada a bacteremias de origem bucal), e *P. gingivalis* induzem agregação de plaquetas, o que pode resultar em formação de trombo (HERZBERG & MEYER, 1996). Quando o *S. sanguinis* é injetado via intravenosa em coelhos, uma série de eventos que simulam um ataque cardíaco (trombocitopenia, traquipnéia, alterações na pressão arterial e nos batimentos cardíacos) ocorrem. Além disso, um ou mais patógenos periodontais têm sido encontrados com relativa freqüência em placas de ateromas de pacientes com periodontite avançada (DORN, DUNN & PROGULSKE, 1999; HARASZTHY *et al.*, 2000). Em outro estudo, Deshpande, Khan e Genco (1998) demonstraram que *P. gingivalis* pode aderir e invadir ativamente células endoteliais do coração de bovinos, células endoteliais aórticas bovinas e células endoteliais de veias umbilicais de humanos. Outros agentes infecciosos, incluindo *Helicobacter pylori* e citomegalovírus também têm sido encontrados em placas ateromatosas (KUVIN & KIMMELSTIEL, 1999).

Infecções respiratórias resultantes da aspiração de saliva, principalmente em pacientes hospitalizados ou debilitados, são eventos relativamente comuns. A pneumonia é uma

infecção do parênquima pulmonar causada por uma variedade de agentes infecciosos, como bactérias, fungos, parasitas e vírus. Acomete principalmente idosos e pacientes imunocomprometidos e é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes de todas as idades (SCANNAPIECO & MYLOTTE, 1996). Os microorganismos podem infectar o trato respiratório baixo por quatro possíveis caminhos: aspiração de conteúdo da orofaringe (MERGRAN & CHOW, 1986), inalação de aerossóis infectados (TOEWS, 1986), disseminação de infecção de sítios adjacentes (LEVISON, 1994) e disseminação via hematogênica de sítios de infecção não pulmonar (FIDDIAN-GREEN & BACKER, 1991). Frequentemente, a pneumonia bacteriana resulta da aspiração da microbiota da orofaringe para o trato respiratório baixo, associada ao fracasso dos mecanismos de defesa do hospedeiro para eliminá-la, multiplicação de microorganismos e subsequente destruição tecidual (BONTEN *et al.* 1994). É provável que a maioria dos patógenos colonize inicialmente a superfície da cavidade oral ou a mucosa da faringe antes da aspiração (BONTEN *et al.* 1994). Espécies capazes de causar infecções respiratórias, tais como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp e *Candida albicans* são normalmente encontradas em amostras da cavidade oral e secreções naso-faríngeas. Membros da microbiota oral normal ou patogênica também podem ser aspirados, levando a um quadro de pneumonia (SCANNAPIECO & MYLOTTE, 1996). A placa dentária subgengival, especialmente em pacientes com doença periodontal, apresenta uma grande proporção de bactérias anaeróbias que podem levar à pneumonia. Dentre as espécies orais frequentemente implicadas na pneumonia infecciosa estão *A. actinomycetemcomitans* (YUAN, LUH & YANG, 1994), *Actinomyces israelii* (MORRIS & SEWELL, 1994), *Capnocytophaga* spp. (LORENZ & WEISS, 1994), *Eikenella corrodens* (JOSHI, O'BRIAN & APPELBAUN, 1991), *P. intermedia* e *Streptococcus constellatus* (SHINZATO & SAITO, 1994).

1.5. Transmissão e Disseminação de Patógenos da Cavidade Oral

A incidência de bacteremias seguidas de procedimentos odontológicos, tais como extração dentária, tratamento endodôntico e cirurgia periodontal, tem sido muito bem documentada (DRINNAN & GOGAN, 1990; LOFTHUS *et al.*, 1991; BONTEN *et al.*, 1994; DEBELIAN, OLBEN & TRONSTAT, 1995; NAVAZESH & MULLIGAN, 1995). Heimdahl e colaboradores (1990) demonstraram a presença bacteriana em 100% das amostras de sangue de pacientes submetidos à extração dentária, e em 20% das amostras de pacientes após tratamento endodôntico. Outros estudos têm demonstrado a ocorrência de bacteremias após procedimentos odontológicos não invasivos, como sondagem periodontal (DALY, 1999), profilaxias (ROBERTS, 1997), e até mesmo na ausência de procedimentos odontológicos (BAYLISS, 1983), tais como mastigação ou escovação dental caseira (HERZBERG & MEYER, 1998). A disseminação de microorganismos da cavidade oral através da corrente sanguínea é um evento comum. Em menos de um minuto após um procedimento oral, microorganismos de sítios infectados podem alcançar o coração, pulmões e vasos sanguíneos periféricos (KILIAN, 1982).

Três mecanismos que correlacionam microorganismos da cavidade oral a efeitos sistêmicos secundários têm sido propostos (THODEN VAN VELZEN, ABRAHAM-INPIJIN & MOORER, 1984; OVERHOLSER, MOREILLON & GLAUSER, 1987; OKUDA & EBIHARA, 1998). Estes incluem disseminação metastática da infecção como um resultado de uma bacteremia transitória, dano metastático resultante de efeitos de toxinas bacterianas orais circulantes, e inflamação metastática causada por dano imunológico induzido por microorganismos orais (Tabela 1) (página 59).

Infecção metastática: Como discutido anteriormente, as infecções orais e os procedimentos dentários podem causar bacteremia transitória. Os microorganismos que

ganham a corrente sanguínea e circulam por todo o organismo são normalmente eliminados pelo sistema reticuloendotelial dentro de minutos, não acarretando nenhum sintoma clínico (KILIAN, 1982; THODEN VAN VELZEN, ABRAHAN-INJIPIN & MOORER, 1984). No entanto, se os microorganismos disseminados encontrarem condições favoráveis, podem então colonizar um sítio qualquer, induzindo uma série de alterações biológicas no local.

Dano metastático: Algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas possuem a habilidade de produzir proteínas solúveis, ou exotoxinas, que incluem enzimas citolíticas e toxinas diméricas com subunidades A e B. As exotoxinas possuem ações farmacológicas específicas e são consideradas “o veneno mais poderoso e letal conhecido” (HAMMOND, 1992). A endotoxina é um LPS que, quando introduzido no hospedeiro pode dar origem a um grande número de manifestações patológicas. O LPS é continuamente liberado por bactérias periodontopatogênicas Gram-negativas durante seu crescimento *in vivo* (MC GHEE, 1982).

Inflamação Metastática: Antígenos bacterianos solúveis podem ter acesso à corrente sanguínea, reagir com anticorpos circulantes específicos e formar complexos macromoleculares. Estes imunocomplexos podem, então, se depositar em determinados sítios do organismo e dar origem a uma variedade de reações inflamatórias agudas e crônicas nesses locais, levando ao dano tecidual (THODEN VAN VELZEN, ABRAHAN-INJIPIN & MOORER, 1984; VAN DYKE *et al.*, 1986).

1.6. Cavidade Oral: Reservatório de Bactérias Patogênicas?

Tem sido crescente o interesse na busca de espécies oportunistas na cavidade oral, pois microorganismos que crescem em biofilme, como o biofilme dental, tendem a ser menos susceptíveis à ação dos antimicrobianos e ao sistema imune, o que pode levar a sérias implicações clínicas, como a criação de um foco de infecção, re-infecção e insucesso terapêutico (SMITH, JACKSON & BAGG, 2001).

Colombo e colaboradores (2002) avaliaram a presença e os níveis de uma grande variedade de espécies bacterianas em amostras de biofilme subgingival de indivíduos com periodontite crônica provenientes de uma população urbana brasileira. Um aspecto importante identificado foi a elevada prevalência de espécies não comumente encontradas na microbiota subgingival, tais como *Acinetobacter baumannii* (20%), *Bartonella* sp. (50%), *Escherichia coli* (27%), *Enterococcus faecalis* (37%) e *P. aeruginosa* (20%). Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisadores reportou que as espécies *Corynebacterium diphtheriae*, *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *A. baumannii* e *Streptococcus pyogenes* foram detectadas em altos níveis e frequência em amostras de biofilme subgingival de pacientes com periodontite, inclusive de sítios com saúde periodontal (SOUTO *et al.*, 2006). Resultados semelhantes foram encontrados por Slots e colaboradores (1991) que relataram uma prevalência de 23% de entéricos e espécies de *Acinetobacter* na microbiota subgingival de pacientes com periodontite na República Dominicana. Ali e colaboradores (1996) observaram uma prevalência de 61,1% de entéricos na microbiota de pacientes com doença periodontal em uma população na Romênia.

As espécies bacterianas *P. aeruginosa* e *A. baumannii* são conhecidas como importantes agentes infecciosos da fibrose cística e infecções hospitalares, respectivamente. São comumente encontradas no meio ambiente e em diferentes sítios do organismo humano. No ambiente oral, porém, elas têm sido associadas à periodontite refratária (SLOTS, FEIK & RAMS, 1990; RAMS, BABALOLA & SLOTS, 1990; COLOMBO *et al.*, 1998), provavelmente devido à sua alta resistência a antimicrobianos. *Acinetobacter* spp. têm sido responsáveis por vários surtos de infecções nosocomiais em diferentes regiões do mundo, sendo estas infecções de difícil controle e tratamento. *P. aeruginosa* é capaz de resistir após o debridamento e cirurgia periodontais (SLOTS, FEIK & RAMS, 1990). Esta espécie tem sido encontrada em alta prevalência no biofilme dental de indivíduos idosos e/ou hospitalizados,

principalmente em pacientes com higiene oral deficiente (SCANNAPIECO, 1998). Este fato tem sido associado a um maior risco de desenvolvimento de infecções respiratórias em pacientes submetidos à anestesia endotraqueal e ventilação mecânica devido à aspiração de saliva contendo níveis elevados desses patógenos (SCANNAPIECO & MYLOTTE, 1996).

Em um artigo de revisão, Smith, Jackson e Bagg (2001) reportaram que o *S. aureus* tem sido isolado tanto de biofilme dental supragengival (GIBBONS *et al.*, 1964; THEILADE *et al.*, 1983; PIOCHI & ZELANT, 1995) como de biofilme subgengival (GIBBONS *et al.*, 1963; SANCHEZ-CORDERO, HOFFMANN & STALL, 1979; MOORE, HOLDEMAN & CATO, 1985; RAMS, BABALOLA & SLOTS, 1990; HELOVUO, HAKKANAIEN & PAUNIO, 1993; DAHLEN & WIKSTROM, 1995; KAMMA, NAKOU & BAEHNI, 1999), sugerindo que este microorganismo faz parte da microbiota normal da cavidade oral. Com isso, a prevenção da transmissão horizontal de *S. aureus* tem se tornado bastante importante, já que a prevalência deste patógeno é crescente. Outros autores demonstraram que a prevalência de espécies do gênero *Staphylococcus* na cavidade oral tem variado de 94% a 100% em adultos saudáveis (PERCIVAL, CHALLACOMBE & MARSH, 1991; KIM, YOU & KIM, 1995; JACKSON *et al.*, 1999). Um outro estudo realizado por Miyake e colaboradores (1991) concluiu que 19% dos isolados de *S. aureus* obtidos de cavidade oral produziam toxina exfoliativa e 40% produziam enterotoxinas. O carreamento oral de *S. aureus* metilina-resistente (MRSA) também tem sido bem documentado (MARTIN & HARDY, 1991; ROUSSEAU, 1991; OWEN, 1994; TAWARA, HONMA & NAITO, 1996; ROSSI *et al.*, 1997), o que pode implicar em re-colonização para outros sítios do organismo ou infecção cruzada para outros indivíduos.

Outro patógeno também associado à resistência a antimicrobianos é o *E. faecalis*. Os *Enterococcus* são microorganismos comensais que habitam os tratos gastrointestinal e vaginal, além da cavidade oral (JETT, HUYCKE & GILMORE, 1994). Essas espécies são

consideradas a quarta principal causa de infecções nosocomiais, e causam infecções oportunistas em indivíduos com doenças graves e imunocomprometidos (ELSNER *et al.*, 2000). Devido à resistência a vários antibióticos, como penicilinas, aminoglicosídeos e atualmente vancomicina, infecções causadas por esse microorganismo são muito difíceis de serem tratadas (ELSNER *et al.*, 2000). *E. faecalis* também tem sido isolada de pacientes com periodontites (RAMS *et al.*, 1992) e de infecções endodônticas (SIQUEIRA *et al.*, 2002). Nesse último caso, esta espécie está associada ao insucesso no tratamento endodôntico e persistência da infecção (ROÇAS, SIQUEIRA & SANTOS, 2004).

O biofilme dental e a saliva também têm sido implicados como possíveis fontes de *H. pylori*. Este microorganismo está associado à gastrite crônica e úlcera duodenal, sendo considerado um fator de risco para o câncer de estômago. Cerca de 50% da população mundial apresenta infecção por este microorganismo (DIXON, 1991; GENTA, HAMMER & GRAHAM, 1993; CAMMAROTA *et al.*, 1996). Sua transmissão pode se dar por via oral e/ou fecal (KELLY *et al.*, 1994; MADINIER, FOSSE & MONTEIL, 1997; DOWSET *et al.*, 1999). A infecção pelo *H. pylori* tem uma boa resposta terapêutica a antimicrobianos, sendo a taxa de erradicação desta espécie entre 80-90%. Entretanto, re-infecção do estômago pode ocorrer após tratamento, sendo que o *H. pylori* isolado do biofilme dental e da biópsia gástrica podem ser do mesmo clone (MAPSTONE *et al.*, 1993; MIYABAIASHI *et al.*, 2000; OKUDA *et al.*, 2003). Uma grande variabilidade na prevalência desta espécie na cavidade oral (0-90%) tem sido reportada em diferentes populações (CAMMAROTA *et al.*, 1996; MIYABAIASHI *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 2000; AVCU *et al.*, 2001; UMEDA *et al.*, 2003). *H. pylori* tem sido detectado em saliva, biofilme supragengival, biofilme subgengival e dorso da língua (MAPSTONE *et al.*, 1993; CAMMAROTA *et al.*, 1996; OSHOWO *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 2000, AVCU *et al.*, 2001; GEBARA *et al.*, 2004). Alguns pesquisadores têm questionado se a presença de *H. pylori* na cavidade oral poderia ser uma fonte de re-infecção

desta espécie no estômago após tratamento. Logo, a detecção deste patógeno na cavidade oral, principalmente de indivíduos portadores de infecções como periodontites é de grande importância na prevenção, tratamento e prognóstico desta infecção gástrica. (MIYABAYASHI *et al.*, 2000).

Além da detecção de espécies reconhecidas, Paster, Olsen e Dewhrist (2006) reportaram uma alta prevalência de espécies ainda não identificadas e/ou não cultiváveis em um grande número de amostras de biofilmes orais. Outros estudos microbiológicos sobre a composição do biofilme dental têm detectado a presença de vírus, principalmente da família *herpesviridae* (CONTRERAS, NOWZARI & SLOTS, 2000; CONTRERAS & SLOTS 2001; KAMMA, CONTRERAS & SLOTS, 2001). Esses dados da literatura sugerem que a grande complexidade do ambiente oral e do biofilme dental favorece o estabelecimento dessas espécies patogênicas, que normalmente não são consideradas membros da microbiota oral anfibiótica. Essa complexidade parece ser ainda maior em condições de doença oral, como nas periodontites. Além disso, é provável que essas espécies patogênicas desenvolvam relações sinérgicas ou antagonistas com bactérias orais, como observado para *H. pylori* e *F. nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum* e *P. gingivalis* (ISHIHARA, MIURA & KIMIKUZA, 1997), e em co-infecções de herpesvirus com *T. forsythia* e/ou *P. gingivalis* (KAMMA, CONTRERAS & SLOTS, 2001) em sítios com lesão periodontal. O papel dessas espécies não orais na patogênese da doença periodontal não é totalmente compreendido. Entretanto, estes dados sugerem que bolsas periodontais podem funcionar como verdadeiros reservatórios e focos de infecção dessas espécies que podem se disseminar para outras partes do organismo humano. Esse fenômeno se torna um fato preocupante quando essas espécies são resistentes a vários antimicrobianos. A presença desses patógenos na cavidade oral pode levar à transmissão de genes de resistência para espécies periodontopatogênicas, o que poderia resultar em consequências drásticas para o tratamento da doença periodontal. Mais

alarmante seria para a clínica médica se o paciente carreador dessas espécies superinfectantes fosse submetido a qualquer procedimento cirúrgico envolvendo ambiente hospitalar, ou desenvolvesse um quadro qualquer de imunossupressão grave. Nessas situações, este indivíduo estaria mais susceptível a desenvolver infecções oportunistas, geralmente de difícil tratamento em diferentes partes do organismo ocasionadas por esses patógenos provenientes da cavidade oral.

2. OBJETIVOS

O presente estudo teve como principal objetivo fazer um levantamento epidemiológico da ocorrência de microorganismos patogênicos de importância médica na microbiota oral de indivíduos de uma amostra da população brasileira com diferentes condições clínicas periodontais.

Para a realização desta proposta, quatro objetivos específicos foram determinados:

- ❖ Determinar a prevalência das espécies bacterianas *A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* em amostras de biofilme subgingival de indivíduos com saúde periodontal ou periodontite, através de hibridização com sondas genômicas de DNA e o método do Checkerboard;
- ❖ Determinar a prevalência das espécies bacterianas *E. faecalis*, *H. pylori* e *P. aeruginosa* em amostras de biofilme subgingival e saliva de indivíduos com saúde periodontal ou periodontite, através da metodologia de PCR.
- ❖ Isolar espécies de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativo em amostras de biofilme subgingival e saliva de indivíduos com saúde periodontal ou periodontite e pesquisar a presença do gene *mecA* pela metodologia de PCR;

- ❖ Correlacionar a prevalência dessas espécies com os parâmetros demográficos e clínicos periodontais da população estudada.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção dos indivíduos

A população alvo do estudo incluiu uma amostra de conveniência de 574 indivíduos, sendo 463 com periodontite e 111 com saúde periodontal. Dos 463 pacientes com periodontite, amostras de 269 pacientes foram analisadas através da metodologia do checkerboard, amostras de 169 pacientes foram analisadas através do PCR e amostras de 25 pacientes foram destinadas à cultura. Dos 111 indivíduos controles, amostras de 42 indivíduos foram analisadas através da metodologia do checkerboard, amostras de 56 indivíduos foram analisadas através do PCR, e 13 analisadas pela cultura. Os indivíduos com doença periodontal foram selecionados do Departamento de Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O grupo controle incluiu indivíduos voluntários do mesmo departamento e do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da UFRJ. A fim de participarem do estudo, todos os pacientes e voluntários foram informados sobre a natureza do mesmo e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 1). O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ (Anexo 2). A seleção dos indivíduos ocorreu através do questionário de anamnese (Anexo 3) e exame clínico periodontal. Todos os indivíduos tinham > 18 anos de idade e apresentavam pelo menos 15 elementos dentários. Indivíduos com saúde periodontal não apresentavam perdas dentárias devido à doença periodontal, poderiam ter até 10% dos sítios ou 15% dos dentes com sangramento à sondagem (SAS) e profundidade de bolsa à sondagem (PBS) ou nível clínico de inserção (NCI) = 4 mm em até 5% dos sítios sem SAS concomitantemente. Os indivíduos portadores de periodontite apresentavam mais de 10% dos dentes com NCI e/ ou PBS \geq 5 mm, ou > 15% dos dentes com NCI e/ ou PBS \geq 4 mm, com SAS concomitantemente. Os critérios de exclusão na seleção

dos indivíduos dos dois grupos incluíram: gravidez, amamentação, existência de condições sistêmicas que poderiam afetar a progressão ou tratamento das doenças periodontais, e uso de antibióticos locais ou sistêmicos nos seis últimos meses anteriores ao início do estudo. Todos os indivíduos diagnosticados como doentes foram encaminhados para tratamento no Departamento de Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da UFRJ.

3.2. Exame clínico periodontal

O monitoramento clínico dos pacientes foi realizado por profissionais treinados, segundo as normas determinadas pela Disciplina de Periodontia e Pós-graduação da UFRJ. Para realização do exame clínico periodontal foram utilizados espelho plano nº 5 (Hu-Friedy, Chicago, IL), pinça para algodão (Hu-Friedy) e sonda periodontal milimetrada da Carolina do Norte (Hu-Friedy). As medições clínicas foram realizadas em 6 sítios por dente (mesio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, disto-lingual, lingual e mesio-lingual) em todos os dentes, excluindo-se os terceiros molares, e incluíram: PBS (mm), NCI (mm), presença ou ausência de biofilme supragengival (BS), SAS e supuração (SUP) (HAFFAJEE *et al.*, 1997).

3.3. Coleta das amostras de biofilme subgengival e saliva

Para a análise microbiológica pelo método do Checkerboard, amostras de biofilme subgengival foram coletadas previamente às medições clínicas de até 14 sítios de pacientes com periodontite (7 sítios com as maiores PBS e 7 sítios com as menores PBS), e 7 sítios sadios aleatórios de pacientes com saúde periodontal. Após a remoção de depósitos de biofilme supragengival com gaze estéril, o biofilme subgengival foi obtido do sítio selecionado com curetas Gracey (HuFriedy) estéreis e colocado individualmente em tubos do tipo Eppendorf contendo 150 µL de tampão tris-EDTA (TE, 10 mM de Tris HCl, 1 mM de

EDTA, pH 7,6). Para detecção bacteriana através de PCR, amostras de biofilme subgengival de até 3 sítios sadios de indivíduos com saúde periodontal e de até 6 sítios (3 sítios sadios e 3 sítios com lesão periodontal) de pacientes com periodontite foram obtidas e colocadas em tubos do tipo Eppendorf contendo 100 µL de tampão tris-EDTA. Para o cultivo de espécies de *Staphylococcus*, foi realizado um “pool” de biofilme subgengival de sítios sadios de pacientes controles e outro “pool” de sítios com lesão periodontal de indivíduos com periodontite. Essas amostras foram colocadas em tubos criogênicos contendo caldo Mycoplasma com DMSO a 10%. Além disso, foram coletadas em recipientes estéreis amostras de saliva de cada indivíduo, através de bochecho com soro fisiológico a 0,9% por 1 minuto.

3.4. Identificação das espécies bacterianas através do Checkerboard

A identificação bacteriana diretamente nas amostras de biofilme subgengival foi realizada pela técnica de Checkerboard descrita por Socransky e colaboradores (1994) e modificada por Haffajee e colaboradores (1997). As sondas de DNA foram confeccionadas utilizando-se o “Random primer digoxigenin labeling kit” (Roche Molecular Systems, Inc, Alameda, CA), conforme as instruções do fabricante. Todas as cepas bacterianas utilizadas na confecção das sondas genômicas foram obtidas da coleção de bactérias do Laboratório de Microbiologia Oral, do Instituto de Microbiologia da UFRJ (Tabela 2) (página 53). Às amostras de biofilme subgengival contidas em 150 µL de TE foram adicionados 100 µL de 0,5 M NaOH e a suspensão bacteriana fervida por 10 minutos. Após neutralização com 800 µL de 5 M de acetato de amônia, cada uma das amostras contendo o DNA desnaturado foi depositada em uma das canaletas do Minislot 30 (Immuntics, Cambridge MA) (Figura 2A) (página 60), sobre uma membrana de nylon de 15 X 15 cm (Hybond N+; Amersham Biosciences). Para permitir a fixação do DNA das amostras nas membranas, as mesmas foram incubadas a 120°C por 20 minutos em forno convencional (Fanem Ltda., São Paulo, SP). As

duas últimas canaletas do Minislot foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies investigadas pelas sondas de DNA, em duas concentrações, 10^5 e 10^6 células bacterianas. Após fixação do DNA nas membranas, essas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1 hora numa solução contendo 50% formamida, 1% caseína, 5 X SSC, 25mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45” (Immunetics) (Figura 2B) (página 61), com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às canaletas do “Miniblotter”. Em cada canaleta foram colocados 135 μL de cada sonda específica diluída em solução de hibridização contendo 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 ng/mL de sonda de DNA específica. O aparato foi então incubado a 42°C por no mínimo 16 horas para hibridização. Após hibridização com as sondas, as membranas foram removidas do “Miniblotter” e lavadas duas vezes por 20 minutos, a 68°C , numa solução adstringente (0,1 X SSC, 0,1% SDS), a fim de remover sondas que não hibridizaram completamente. Em seguida, as membranas foram imersas por 1 hora numa solução contendo 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, 0,5% de caseína (pH 8,0), e por 30 minutos na mesma solução contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche), numa diluição de 1/15.000. As membranas foram, então, lavadas com uma solução de 0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20 (pH 8,0), 2 vezes por 20 minutos, e uma vez por 5 minutos em 0,1 M de Tris - HCl e 0,1 M de NaCl (pH 9,5). Em seguida, as membranas foram incubadas em uma solução contendo o substrato fluorescente ECF[®] (Amersham Pharmacia). Após incubação por 24 horas, os sinais de fluorescência resultantes da hibridização das sondas com as amostras foram captados por um sistema de captação de imagens (Storm[™] 860, Molecular Dynamics / Amersham Biosciences) (Figura 3) (página 62). A leitura dos sinais foi realizada visualmente por um único indivíduo treinado, e os sinais

detectados comparados aos sinais dos controles de 10^5 e 10^6 células presentes na mesma membrana. A detecção do sinal e a análise semiquantitativa das espécies bacterianas foram estimadas como: 0 = não detectável; 1 < 10^5 ; 2 = 10^5 ; 3 = 10^5 - 10^6 ; 4 = 10^6 e 5 > 10^6 células bacterianas. A sensibilidade deste teste foi ajustada para permitir a detecção de pelo menos 10^4 células de cada espécie através do ajuste da concentração de cada sonda genômica. Este procedimento foi empregado a fim de fornecer a mesma sensibilidade de detecção para cada sonda. A não detecção de sinal foi interpretada como sendo zero. Entretanto, este valor não implicou na ausência total de determinada espécie, já que de 1 até 1.000 células bacterianas poderiam estar presentes na amostra (SOCRANSKY *et al.*, 2004).

3.5. Identificação das espécies bacterianas através de PCR

3.5.1. Extração de DNA das amostras de biofilme e saliva

A extração de DNA das amostras de biofilme subgingival foi realizada segundo metodologia descrita por Ashimoto, Bakker e Slots (1996). À massa celular foi adicionado o tampão TE 10:1 (10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, pH 7,6) contendo 0,5 mg/mL de lisozima. Após incubação a 37°C por 15 min, foram adicionados SDS a 1% e 0,1 mg/mL de proteinase K, permanecendo a mistura a 37°C por 30 min. Em seguida, foi adicionado 1 M de perclorato de sódio e incubado a 50°C por 1 hora. A separação do DNA de outros constituintes foi realizada em três etapas de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Ao sobrenadante final foram acrescentados 2 volumes de etanol absoluto gelado, mantendo-se por 12-16 horas a -20°C. O DNA foi recuperado por centrifugação a 10.000 X g por 30 min, lavado em etanol 70% e re-suspendido em TE. A extração de DNA da saliva foi realizada pela metodologia descrita por Laine e colaboradores (2000). Os pacientes não podiam escovar os dentes ou ingerir alimentos 30 minutos antes da coleta da saliva. Cada indivíduo bochechou com 10 mL de solução salina a 0,9 % por 60 segundos. Amostras

coletadas das soluções bochechadas foram centrifugadas a 300 x g por 10 minutos. O pellet foi lavado duas vezes em solução salina a 0,9%, re-suspendido em 100 µL de NaOH a 50 mM e fervido por 10 minutos. As amostras foram neutralizadas com 14 µL de Tris 1 M (pH 7,5), e centrifugadas a 14.000 x g por 3 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e estocados a -20°C até a análise microbiológica pelo método da PCR.

3.5.2. Detecção da espécie *H. pylori*

Foram utilizados 10 µL de DNA de cada amostra de biofilme subgingival e saliva em um volume final de reação de 25 µL, contendo 25 pM de cada iniciador específico, 2,5 µL de tampão PCR 10X (200 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 500 mM de KCl) (Promega), 1,5 mM de MgCl₂ (Promega), 1,25 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (Promega). Os iniciadores utilizados foram os reportados por Gebara e colaboradores (2004): 5`-CGTTAGCTGCATTACTGGAGA-3` e 5`-GAGCGCTAGGCGGGATAGTC-3`. Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, 40 ciclos de amplificação foram realizados através de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de extensão foi realizada a 72°C por 10 minutos. Um amplicon de 295 pb foi observado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo, em transiluminador ultra-violeta (Figura 4) (página 63).

3.5.3. Detecção da espécie *E. faecalis*

Foi utilizado 1 µL de DNA de cada amostra de biofilme e saliva em um volume final de reação de 50 µL, além de 1 µM de cada iniciador específico, 5 µL de tampão PCR 10X (200 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 500 mM de KCl), 2 mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq DNA

polimerase (Promega) e 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (Promega). Os iniciadores utilizados foram descritos por Roças, Siqueira e Santos (2004): 5'-GTTTATGCCGCATGGCATAAGAG-3' e 5'-CCGTCAGGGGACGTTTCAG-3' (amplicon de 310 pb). Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, 26 ciclos de amplificação foram realizados através de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de extensão foi realizada a 72°C por 2 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (Figura 5) (página 64).

3.5.4. Detecção da espécie *P. aeruginosa*

Foram utilizados 20 µL de DNA de cada amostra em um volume final de reação de 100 µL, além de 30 pmol de cada iniciador específico, 10 µL de tampão PCR 10X (200 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 500 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 2 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (Promega). Foram usados dois pares de iniciadores descritos por De Vos e colaboradores (1997): PS-1 5'-ATGAACAACGTTCTGAAATTCTCTGC-3' e PS-2 5'-CTTGCGGCTGGCTTTTTCCAG-3' (amplicon de 250 pb); e PAL-1 5'-ATGGAAATGCTGAAATTCGGC-3' e PAL-2 5'-CTTCTTCAGCTCGACGCGACG-3' (amplicon de 510 pb). Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, foram realizados 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 40 segundos, anelamento a 57°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto, e uma etapa final de extensão de 72°C por 2 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo (Figura 6) (página 65).

3.5.5. Detecção de DNA bacteriano

Um par de iniciadores universais bacterianos (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' and 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT- 3') (amplicon de 1.505 pb) descrito por Willis e colaboradores (1999) foi utilizado para indicar a presença de DNA bacteriano em todas as amostras clínicas, particularmente naquelas que foram negativas para as espécies bacterianas avaliadas. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25 µL que continha: 0,2 mM de cada iniciador universal, 2,5 µL de tampão de PCR 10X, 2 mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq e 200 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (Promega). Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 97°C por 1 min, 30 ciclos de amplificação foram realizados através de desnaturação a 97°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de extensão foi realizada a 72°C por 4 minutos.

3.6. Identificação e caracterização fenotípica de *Staphylococcus*

As amostras de biofilme subgingival estocadas em tubos criogênicos contendo caldo Mycoplasma com 10% de DMSO foram transferidas para tubos contendo 5 mL de meio TSB (Difco) com 6,5% de NaCl e incubadas a 37°C por um período de até 48 horas. As amostras crescidas em TSB foram inoculadas em placas contendo Ágar Manitol Salgado (Plastlabor) e incubadas a 37°C por até 48 horas. As amostras foram caracterizadas como *S. aureus* ou *Staphylococcus* coagulase-negativo através da mudança de cor do meio, aspecto morfotintorial através da coloração de Gram, do teste da catalase e coagulase. Após o crescimento da amostra no Ágar Manitol Salgado, foi realizado um esfregaço em lâmina de vidro. Este foi corado pelo método de Gram e observado em microscópio óptico em objetiva de 100X (imersão). A observação da produção de catalase foi efetuada por metodologia convencional, em lâmina de vidro. Uma suspensão foi

depositada sobre uma gota de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3% (v/v). A formação de bolhas resultantes da hidrólise do H_2O_2 por ação da enzima catalase foi indicativa de reação positiva. As cepas padrão utilizadas neste teste foram *S. aureus* ATCC 25923 e *S. pyogenes* ATCC 8668, como controles positivo e negativo, respectivamente. O teste da produção da coagulase foi realizado em tubo de ensaio, no qual foi misturado 0,1 mL da suspensão bacteriana em 0,5 mL de plasma de coelho, seguido de incubação a 37°C por até 4 horas, sempre observando a formação ou não de coágulo. Os tubos foram incubados por até 24 horas em caso de cepas positivas tardias. As amostras padrão utilizadas neste teste foram *S. aureus* ATCC 25923 e *S. epidermidis* ATCC 14579, como controles positivo e negativo, respectivamente.

3.7. Identificação genotípica das espécies de *Staphylococcus* e a presença do gene *mecA*

A identificação genotípica e detecção de fatores de virulência das espécies isoladas de *S. aureus* e *Staphylococcus* coagulase-negativos foram realizadas através de PCR. O DNA foi obtido das cepas isoladas pelo método descrito Smith, Socransky e Smith (1989). Após crescimento, as suspensões bacterianas foram centrifugadas duas vezes por 5 minutos a 12.000 x g em tampão TE (pH 7,6). As espécies gram-positivas foram tratadas previamente com lisozima por 1h a 37°C em banho-maria. Os sedimentos foram novamente suspensos em tampão TE contendo 10% de SDS e proteinase K (Amersham Pharmacia Biotech), e incubados a 37°C por 1 hora. Após incubação, foram adicionados à solução 150 µL de NaCl 5M e 85 µL de solução de CTAB 10% e NaCl 0,7M. Após nova incubação em banho-maria a 65°C por 20 minutos, 800 µL de clorofórmio: álcool isoamil (24:1) foi adicionado e a suspensão centrifugada por 12 minutos a 12.000 x g. O sobrenadante foi transferido para

outro tubo e tratado com isopropanol para precipitação do DNA. Após centrifugação por 2 minutos e remoção do isopropanol, o DNA foi suspenso em tampão TE contendo 2 µL de RNase e re-incubado durante 60 minutos a 50°C. Posteriormente, a suspensão foi tratada com 3 M de acetato de sódio e 400 µL de clorofórmio:álcool (24:1). A obtenção do precipitado de DNA foi realizada por sucessivas lavagens em etanol gelado nas concentrações 95 % e 70 %. O DNA extraído foi suspenso em tampão TE e estocado à -20°C. A quantificação do DNA e o grau de pureza da extração foram determinados através da obtenção das densidades óticas (DO) realizadas em espectrofotômetro convencional. Foi utilizado 1 µL de DNA das cepas isoladas das amostras em um volume final de reação de 100 µL, além de 10 pmol de cada iniciador específico, 10 µL de tampão PCR 10X (200 mM de Tris-HCl, pH 8,0 e 500 mM de KCl), 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de Taq DNA polimerase (Promega) e 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (Promega). Os iniciadores utilizados na reação de amplificação foram descritos por Mason e colaboradores (2001), e estão apresentados na Tabela 3 (página 54). Após realização de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, 36 ciclos de amplificação foram realizados incluindo desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma etapa final de extensão foi realizada a 72°C por 10 minutos. Todas as reações de PCR foram realizadas em um termociclador (MMG- Biotech). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) e fotografado sob luz ultravioleta (Figura 7) (página 66). As cepas controle utilizadas para esses experimentos foram *S. aureus* ATCC 25923, *S. epidermidis* ATCC 14579, MRSA USA 100 e MRSE HC 687. Todas as amostras e isolados clínicos foram estocados em freezer -20°C para futuras análises de genotipagem.

3.8. Análise estatística

Todos os testes estatísticos empregados no presente estudo foram realizados utilizando-se o programa estatístico SPSS (“Statistical Package for the Social Sciences”), versão 10.0. As medidas clínicas foram computadas em todos os sítios periodontais examinados e suas médias calculadas para cada indivíduo e, posteriormente, dentro de cada grupo. Diferenças clínicas significativas entre os dois grupos foram determinadas pelos testes de Mann-Whitney e Qui-quadrado. Os dados microbiológicos referentes à detecção das espécies bacterianas através do método do Checkerboard foram expressos como média da frequência (prevalência) e média dos níveis ($X 10^4$ células) de cada espécie nos indivíduos com doença e com saúde periodontal (HAFFAJEE *et al.*, 1997; COLOMBO *et al.*, 2002). A frequência de amostras positivas para uma determinada bactéria foi computada para cada amostra e paciente, e a média dessas frequências calculadas em cada grupo clínico. Os registros obtidos dos níveis de cada espécie (0 a 5) nas amostras foram convertidos em números absolutos, e suas médias calculadas para cada indivíduo e nos grupos. Diferenças na prevalência e níveis das espécies bacterianas entre os grupos foram avaliadas através do teste de Mann-Whitney. Os dados microbiológicos referentes à detecção das espécies bacterianas através do método de PCR foram expressos como média de frequência (para amostras de biofilme) e frequência (saliva), e diferenças significantes entre os grupos foram determinadas pelos testes de Mann-Whitney, teste exato de Fischer e Qui-Quadrado. Associações entre os parâmetros periodontais e a frequência das espécies bacterianas foram determinadas pelo coeficiente de correlação de Spearman rho. O nível de significância estatística estabelecido para todas as análises foi de 5%.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados Clínicos

Os parâmetros clínicos periodontais e demográficos da população estudada estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6 (páginas 55, 56 e 57, respectivamente). Tanto nas amostras submetidas à análise do checkerboard como nas de PCR e cultura, houve diferenças significativas para todos os parâmetros clínicos entre os 2 grupos. Indivíduos com periodontite apresentaram sinais clínicos de doença significativamente maiores, tais como PBS, NCI, número de dentes ausentes, percentagem de sítios com SAS e BS, em relação aos pacientes com saúde periodontal ($p < 0,01$; teste de Mann-Whitney). Não foram observadas diferenças significativas em relação à distribuição dos sexos nos grupos. Indivíduos com saúde periodontal apresentaram médias de idade significativamente menores do que pacientes com periodontite ($p < 0,01$; teste de Mann-Whitney).

4.2. Resultados Microbiológicos

4.2.1. Detecção das espécies bacterianas por Checkerboard

Um total de 5 sondas de DNA relacionadas às espécies bacterianas patogênicas foram usadas nos ensaios de hibridização pelo método do checkerboard. A frequência média e os níveis das espécies nas amostras de biofilme subgingival dos 311 indivíduos estão demonstrados nas Figuras 8 e 9 (páginas 67 e 68, respectivamente). Todas as espécies estudadas foram detectadas com maior frequência nas amostras de indivíduos com doença periodontal em relação ao grupo controle (Figura 8) (página 67). Diferenças estatisticamente significantes na distribuição desses microorganismos entre os dois grupos clínicos foram observadas para todas as espécies bacterianas (Teste de Mann-Whitney; $p < 0,05$). A espécie

bacteriana mais freqüentemente detectada no total das amostras de biofilme subgingival provenientes dos diferentes sítios periodontais foi *E. faecalis* (29,3%).

Os níveis das espécies bacterianas (número de células X 10⁴) nos diferentes grupos clínicos estão representados na Figura 9 (página 68). Todas as espécies bacterianas foram encontradas em níveis mais elevados nos sítios dos pacientes com doença periodontal em comparação com o grupo de indivíduos com saúde oral. Diferenças significantes nos níveis dos microorganismos avaliados foram observadas entre os dois grupos clínicos para todas as espécies em comparação aos sítios de pacientes saudáveis (Teste de Mann-Whitney; p < 0,05). A espécie bacteriana encontrada em maior quantidade nas amostras avaliadas foi *P. aeruginosa* (3,15 X 10⁴ células).

4.2.2. Detecção das espécies bacterianas *H. pylori*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* por PCR

As freqüências das espécies bacterianas *H. pylori*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em amostras de biofilme subgingival e saliva dos dois grupos clínicos estão apresentadas nas Figuras 10 e 11 (páginas 69 e 70, respectivamente). A espécie bacteriana mais prevalente em todas as amostras avaliadas de todos os indivíduos foi a *P. aeruginosa* (32%). As espécies *H. pylori* e *E. faecalis* foram detectadas em 23,4% e 30% do total de amostras, respectivamente. Quando amostras de saliva foram comparadas com amostras de biofilme subgingival, uma maior prevalência de *H. pylori* foi observada no biofilme subgingival (33,3%) em relação às amostras de saliva (20%; p = 0,03, teste exato de Fischer). Essa diferença foi ainda mais significante no grupo de pacientes com periodontite (saliva = 23,5% X biofilme subgingival = 50%; p = 0,001, teste exato de Fischer). Já para as espécies *E. faecalis* e *P. aeruginosa*, não houve diferença significante na prevalência dessas bactérias entre as amostras de biofilme

subgingival e saliva (Figuras 10 e 11) (páginas 69 e 70, respectivamente). Nas amostras de biofilme subgingival, todas as espécies testadas foram detectadas em frequências significativamente maiores no grupo de pacientes com periodontite em relação ao grupo controle (*H. pylori*: $50 \pm 46\%$ X $11,4 \pm 29\%$, *E. faecalis*: $47,8 \pm 50\%$ X $17,1 \pm 37\%$ e *P. aeruginosa*: $52,2 \pm 50\%$ X $11,4 \pm 34\%$; $p < 0,01$; teste de Mann-Whitney) (Figura 10) (página 69). Do mesmo modo, maiores prevalências dessas espécies bacterianas foram observadas em amostras de saliva de pacientes com periodontite em comparação ao grupo controle (*H. pylori*: $24,3\%$ X $7,7\%$, *E. faecalis*: $40,5\%$ X $14,6\%$ e *P. aeruginosa*: $49,7\%$ X $14,6\%$; $p < 0,01$; teste exato de Fischer) (Figura 11) (página 70).

Associações positivas entre presença das espécies *H. pylori*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* e os parâmetros clínicos periodontais avaliados foram observadas (Tabela 7) (página 58). Somente *H. pylori* mostrou correlação com aumento da idade, porém essa relação foi pouco expressiva. Nenhuma das espécies apresentou associação com sexo. Os maiores coeficientes foram observados entre a detecção de *H. pylori* e PBS e NCI, e entre *P. aeruginosa* e *E. faecalis* com presença de biofilme supragengival.

4.2.3. Detecção das espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* por PCR e a presença do gene *mecA*

A frequência das espécies isoladas de *S. aureus* e *S. epidermidis* nos dois grupos clínicos está representada na Figura 12 (página 71). Não houve diferença significativa na detecção das duas espécies bacterianas entre os dois grupos clínicos avaliados (teste do Qui-quadrado; $p > 0,05$). A grande maioria das amostras bacterianas dos pacientes estudados tanto no grupo com periodontite como no grupo controle foi representada por *S. epidermidis* (75% e 69,2%, respectivamente). A espécie *S. aureus* foi detectada em 20,8% das amostras bacterianas isoladas de pacientes com periodontite e em 7,7% dos pacientes com saúde

periodontal. Nos pacientes com periodontite, das espécies isoladas de *S. aureus*, 20% carregavam o gene *mecA*, enquanto 11,1% dos isolados de *S. epidermidis* carregavam o gene *mecA*. Também não houve diferença significativa na detecção de *S. aureus* e *S. epidermidis* carregadores do gene *mecA* nos dois grupos clínicos estudados (Figura 13) (página 72).

Tabela 1. Possíveis mecanismos que correlacionam presença de microorganismos na cavidade oral e doenças sistêmicas (THODEN VAN VELZEN, ABRAHAN-INJIPIN & MOORER, 1984; OVERHOLSER, MOREILLON & GLAUSER, 1987; OKUDA & EBIHARA 1998).

Mecanismos	Doenças sistêmicas
Infecção Metastática	Endocardite infecciosa subaguda, miocardite bacteriana aguda, sinusite, abscesso pulmonar, celulite orbital, úlcera de pele, osteomielite.
Dano Metastático	Infarto cerebral, infarto agudo do miocárdio, síndrome do choque tóxico, meningite crônica.
Inflamação Metastática	Síndrome de Behcet, urticária crônica, doença de Crown.

Tabela 2. Relação das espécies de bactérias selecionadas para a confecção das sondas genômicas e emprego nos ensaios de hibridização pelo método do Checkerboard.

Espécies bacterianas	Cepas*
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Escherichia coli</i>	33780
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853
<i>Staphylococcus aureus</i>	33591

* ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD).

Tabela 3: Sequência dos iniciadores para detecção de *S. aureus* e *S. epidermidis* e o gene *mecA* segundo Mason *et al.* 2001.

Alvo	Sequência de primers	Amplicon (pb)
16S rRNA de <i>S. epidermidis</i>	5`-CCTATAAGACTGGGATAACTTCGGG-3` 5`- CTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG- 3`	791
ClfA de <i>S. aureus</i>	5`-GCAAAATCCAGCACAACAGGAAACGA-3` 5`- CTTGATCTCCAGCCATAATTGGTGG- 3`	638
<i>mecA</i>	5`-TCCAGGAATGCAGAAAGACCAAAGC-3` 5`- GACACGATAGCCATCTTCATGTTGG- 3`	499
16S r RNA de eubactérias	5`-AACTGGAGGAAGGTGGGGGAT-3` 5`- AGGAGGTGATCCAACCGCA- 3`	371

Tabela 4. Parâmetros clínicos periodontais e demográficos dos indivíduos com periodontite ou saúde periodontal da população analisada pelo método do checkerboard.

PARÂMETROS CLÍNICOS	Saúde Periodontal	Periodontite Crônica
N	42	269
Idade Média (\pm DP) *	30,8 \pm 11	41,8 \pm 12
% Homens	30,3	36,4
Média (\pm EP):		
Profundidade de Bolsa (mm) *	1,8 \pm 0,08	3,1 \pm 0,06
Nível Clínico de Inserção (mm) *	1,9 \pm 0,13	3,7 \pm 0,08
Média (\pm DP):		
N dentes ausentes *	1,7 \pm 3,8	5,3 \pm 4,9
% Sangramento à sondagem *	7,4 \pm 14,2	40,4 \pm 25,6
% Biofilme supragengival *	16,6 \pm 16	63,6 \pm 27,6
% Supuração *	0	6,5 \pm 11

* $p < 0,01$; Refere-se às diferenças significantes entre os grupos clínicos determinadas pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 5. Parâmetros clínicos periodontais e demográficos dos indivíduos com periodontite ou saúde periodontal da população analisada pelo PCR.

PARÂMETROS CLÍNICOS	Saúde Periodontal	Periodontite Crônica
N	56	169
Idade Média (\pm DP) *	34,3 \pm 12	41 \pm 14
% Homens	35,5	34,2
Média (\pm EP):		
Profundidade de Bolsa (mm) *	2,1 \pm 0.5	3,2 \pm 1.2
Nível Clínico de Inserção (mm) *	2,2 \pm 0.6	3,9 \pm 1.5
Média (\pm DP):		
N dentes ausentes *	0,6 \pm 1,5	5,2 \pm 5,3
% Sangramento à sondagem *	1,9 \pm 4,1	47,2 \pm 29
% Biofilme supragengival *	10,1 \pm 10	49 \pm 30
% Supuração *	0	3 \pm 10

* $p < 0.01$; Refere-se às diferenças significantes entre os grupos clínicos determinadas pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 6. Parâmetros clínicos periodontais e demográficos dos indivíduos com periodontite ou saúde periodontal da população estudada para isolamento de *S. aureus* e *S. epidermidis*.

PARÂMETROS CLÍNICOS	Saúde	Periodontite
	Periodontal	Crônica
N	13	25
Idade Média (\pm DP) *	27 \pm 7,5	42 \pm 15
% Homens	42	41
Média (\pm EP):		
Profundidade de Bolsa (mm) *	1,8 \pm 0,08	2,7 \pm 0,12
Nível Clínico de Inserção (mm) *	1,8 \pm 0,07	3,4 \pm 0,3
Média (\pm DP):		
N dentes ausentes *	0,3 \pm 0,6	5,1 \pm 6,1
% Sangramento à sondagem *	3,2 \pm 3,8	45 \pm 24
% Biofilme supragengival *	7,5 \pm 17,5	34,6 \pm 30,4
% Supuração	0	0,7 \pm 1,7

* $p < 0.01$; Refere-se às diferenças significantes entre os grupos clínicos determinadas pelo teste de Mann-Whitney.

Tabela 7. Correlação entre parâmetros clínicos periodontais e prevalência das espécies bacterianas da população analisada pelo PCR.

	<i>H. pylori</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
PBS	0,263* (p < 0,001)	0,180* (p < 0,01)	0,100* (p > 0,05)
NCI	0,267* (p < 0,001)	0,215* (p < 0,001)	0,133* (p < 0,05)
SAS	0,187* (p < 0,01)	0,226* (p < 0,001)	0,244* (p < 0,001)
BS	0,223* (p < 0,001)	0,244* (p < 0,001)	0,259* (p < 0,001)
SUP	0,134* (p < 0,05)	0,073* (p > 0,05)	0,075* (p > 0,05)
Número de dentes ausentes	0,085* (p > 0,05)	0,092* (p > 0,05)	0,175* (p < 0,01)
Idade	0,115* (p < 0,05)	0,059* (p > 0,05)	0,101* (p > 0,05)

* Coeficiente de Spearman rho; Teste de correlação bivariada

PBS: profundidade de bolsa à sondagem; NCI: nível clínico de inserção; SAS: sangramento à sondagem, BS: biofilme supragengival; SUP: supuração

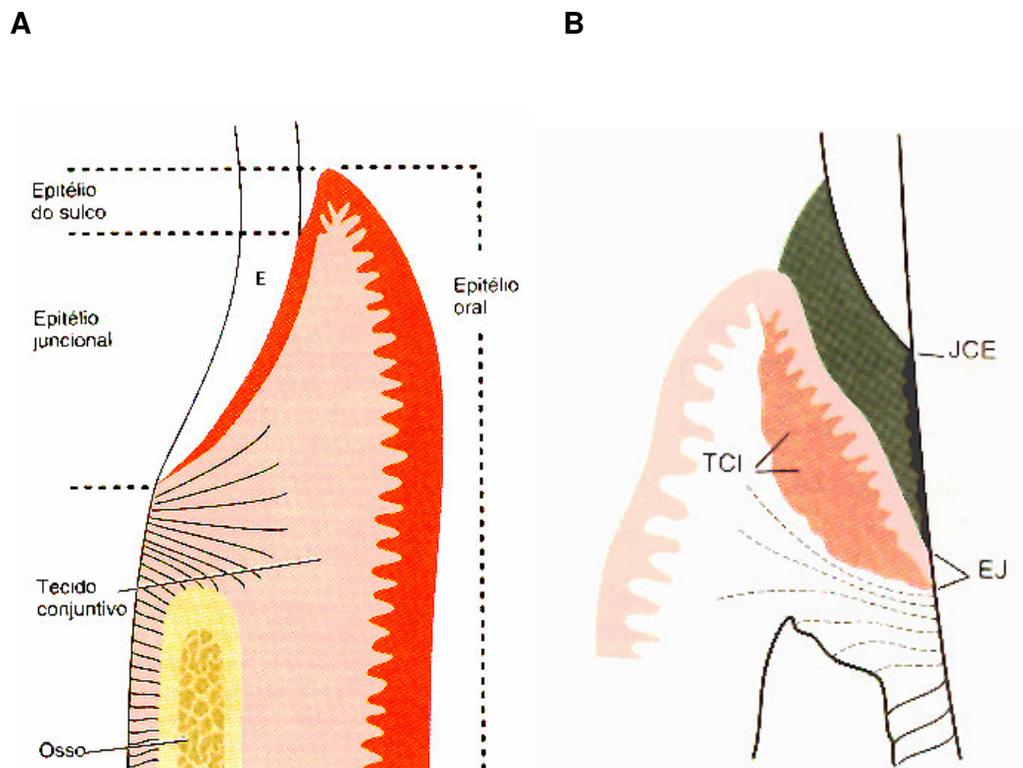


Figura 1. Anatomia do periodonto. (A)-Esquema de um periodonto com saúde periodontal. E, esmalte dentário. (B) Figura esquemática de uma lesão periodontal com a formação da bolsa periodontal. JCE, junção cemento-esmalte; TCI, tecido conjuntivo inflamado; EJ, epitélio juncional. Adaptado de LINDHE, 1999.

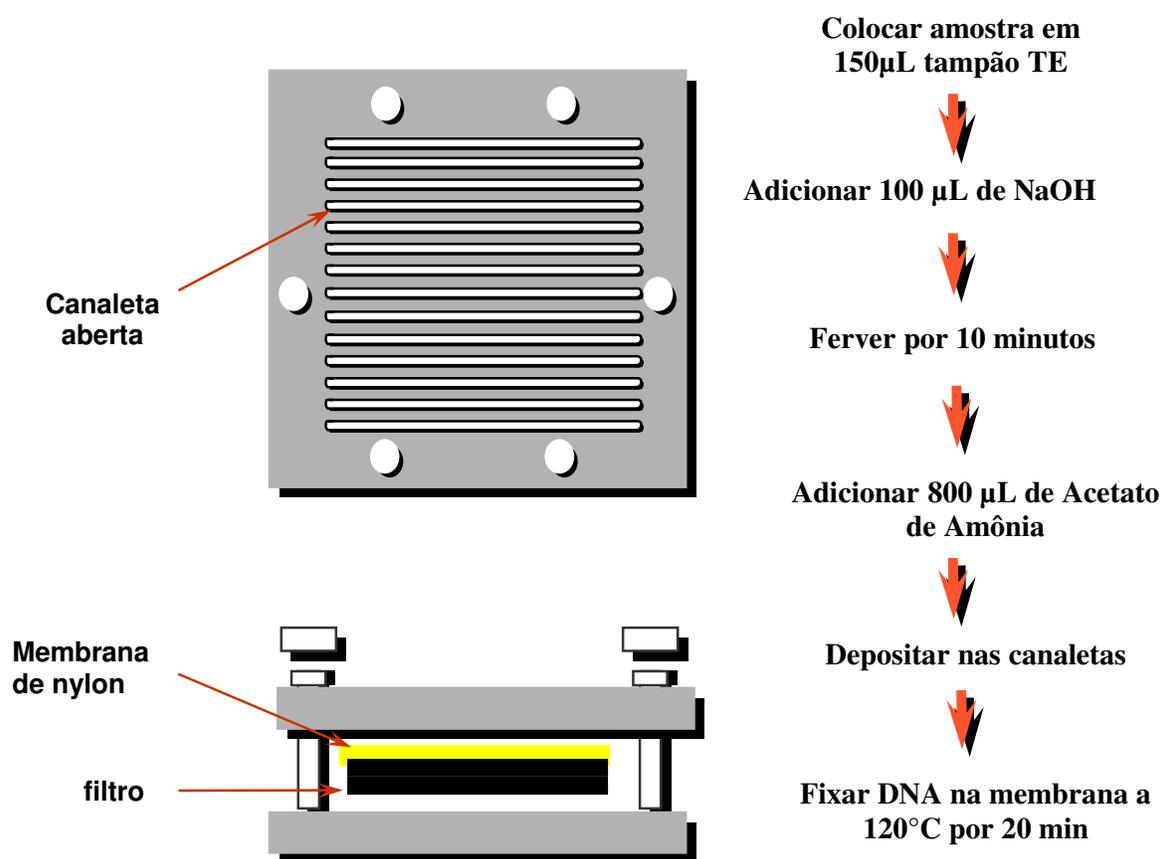


Figura 2A. Esquema do aparato "Minislot 30".

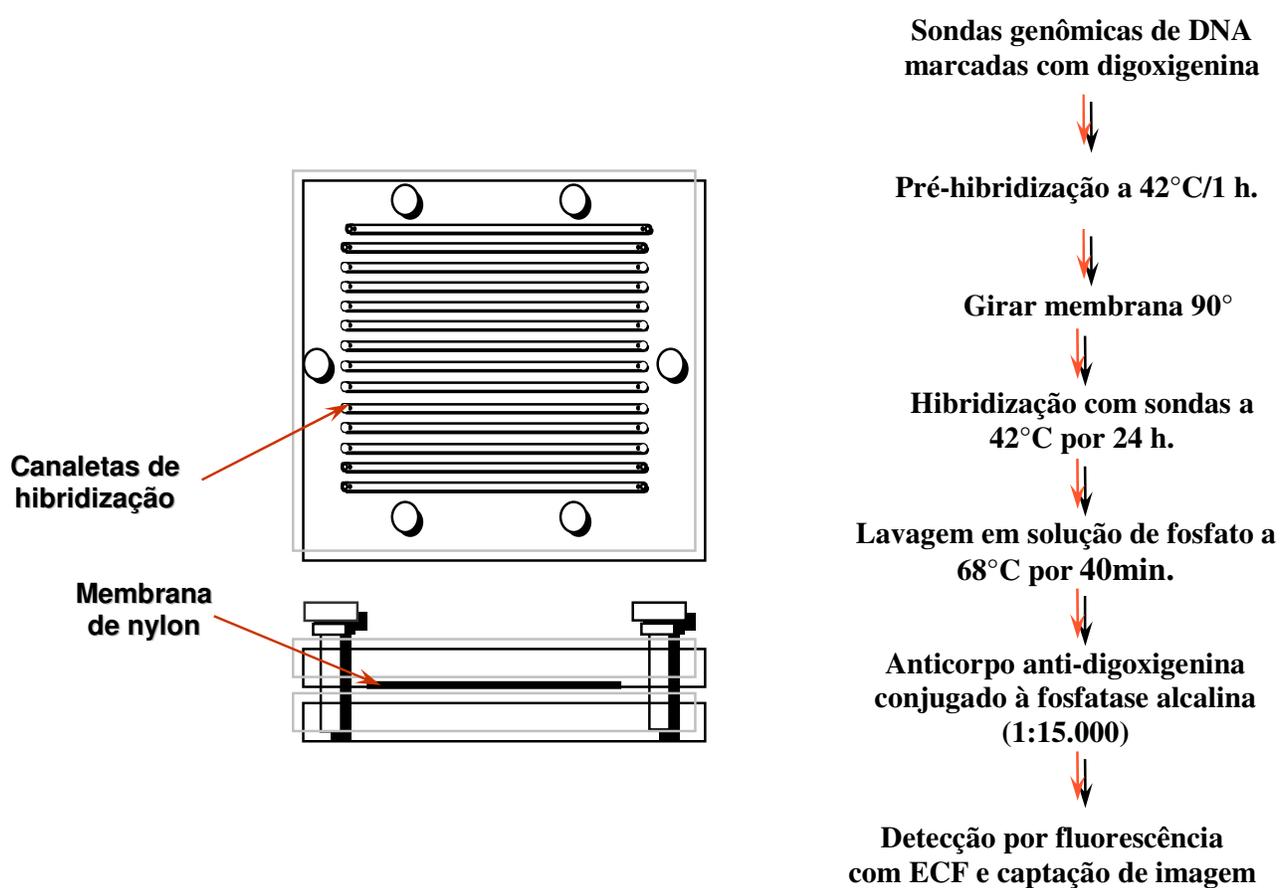


Figura 2B. Esquema do aparato “Miniblotter 45” e hibridização com as sondas de DNA.

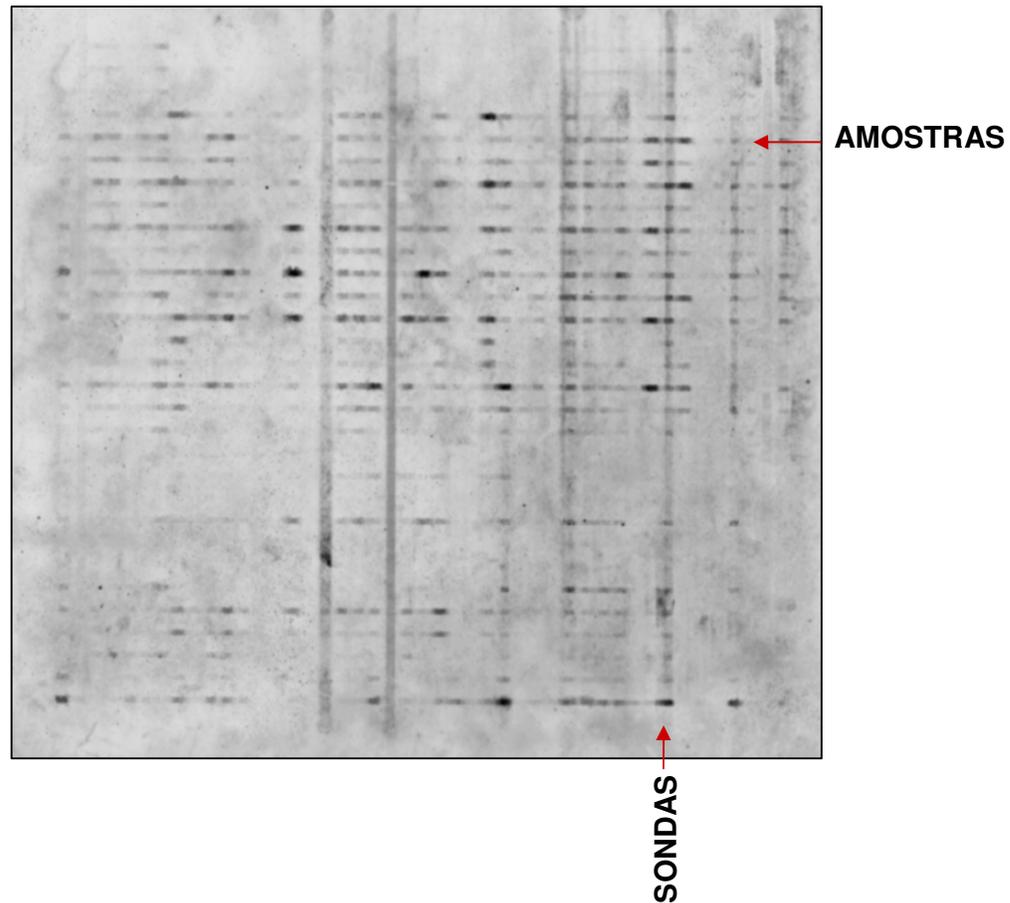


Figura 3. Padrão de hibridização das sondas de DNA com as amostras de biofilme subgingival de pacientes em forma de tabuleiro de xadrez. As últimas duas linhas horizontais são compostas pelos controles de 10^5 e 10^6 células bacterianas.

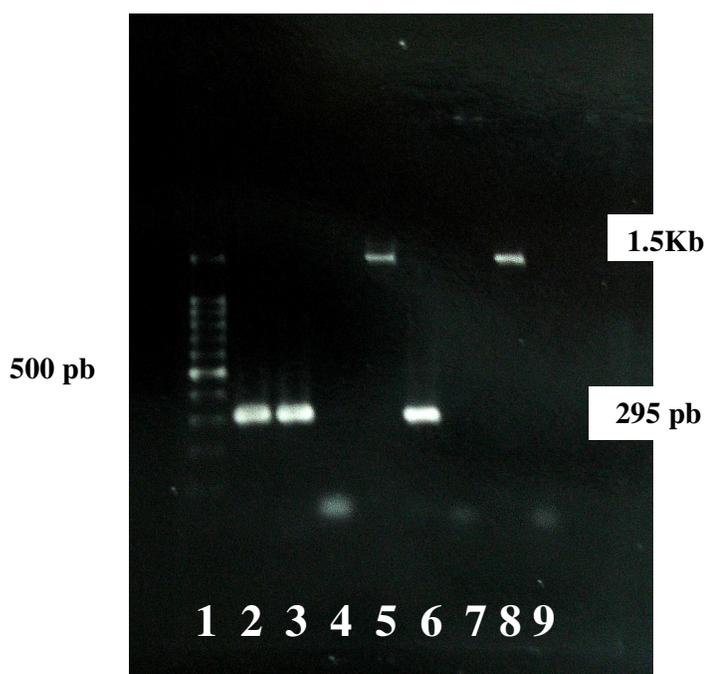


Figura 4. Foto do gel contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para *H. pylori*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo com DNA de *H. pylori* ATCC 43629; 3- amostra de saliva positiva para *H. pylori*; 4- amostra de saliva negativa para *H. pylori*; 5- a mesma amostra de saliva negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 6- amostra de biofilme subgingival positiva para *H. pylori*; 7- amostra de biofilme subgingival negativa para *H. pylori*; 8- a mesma amostra de biofilme subgingival negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 9- controle negativo.

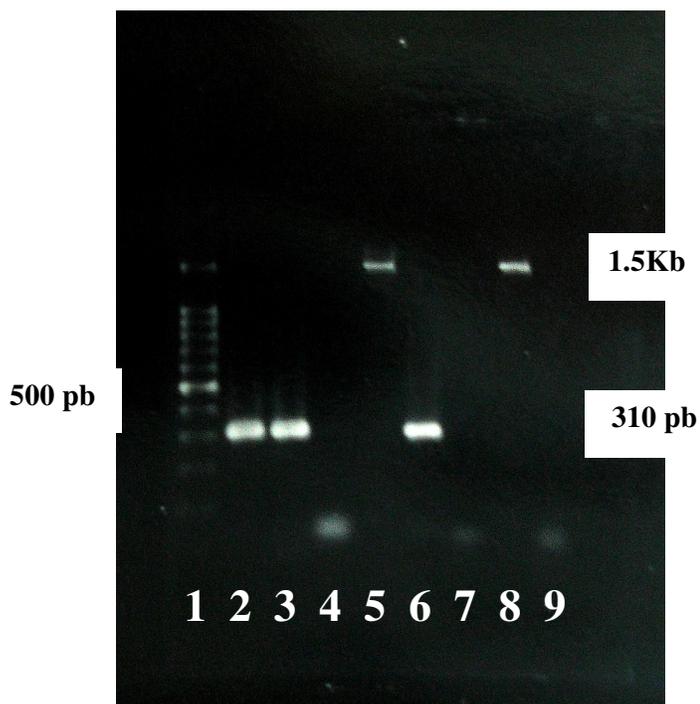


Figura 5. Foto do gel contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para *E. faecalis*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo com DNA de *E. faecalis* ATCC 29212; 3- amostra de saliva positiva para *E. faecalis*; 4- amostra de saliva negativa para *E. faecalis*; 5- a mesma amostra de saliva negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 6- amostra de biofilme subgingival positiva para *E. faecalis*; 7- amostra de biofilme subgingival negativa para *E. faecalis*; 8- a mesma amostra de biofilme subgingival negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 9- controle negativo.

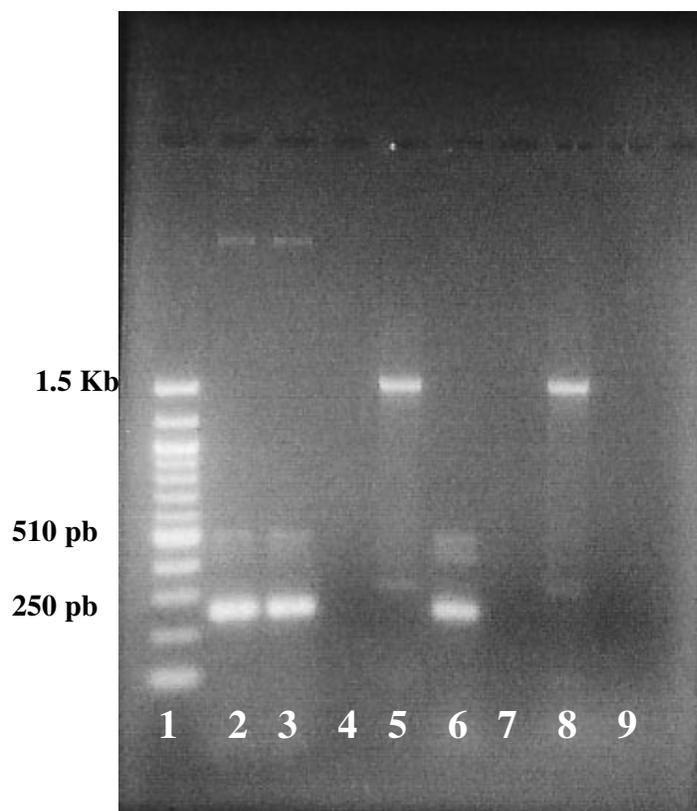


Figura 6. Foto do gel contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para *P. aeruginosa*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 pb ladder; 2- controle positivo com DNA de *P. aeruginosa* ATCC 27853; 3- amostra de saliva positiva para *P. aeruginosa*; 4- amostra de saliva negativa para *P. aeruginosa*; 5- a mesma amostra de saliva negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 6- amostra de biofilme subgingival positiva para *P. aeruginosa*; 7- amostra de biofilme subgingival negativa para *P. aeruginosa*; 8- a mesma amostra de biofilme subgingival negativa, porém positiva para o iniciador universal do 16S bacteriano; 9- controle negativo.

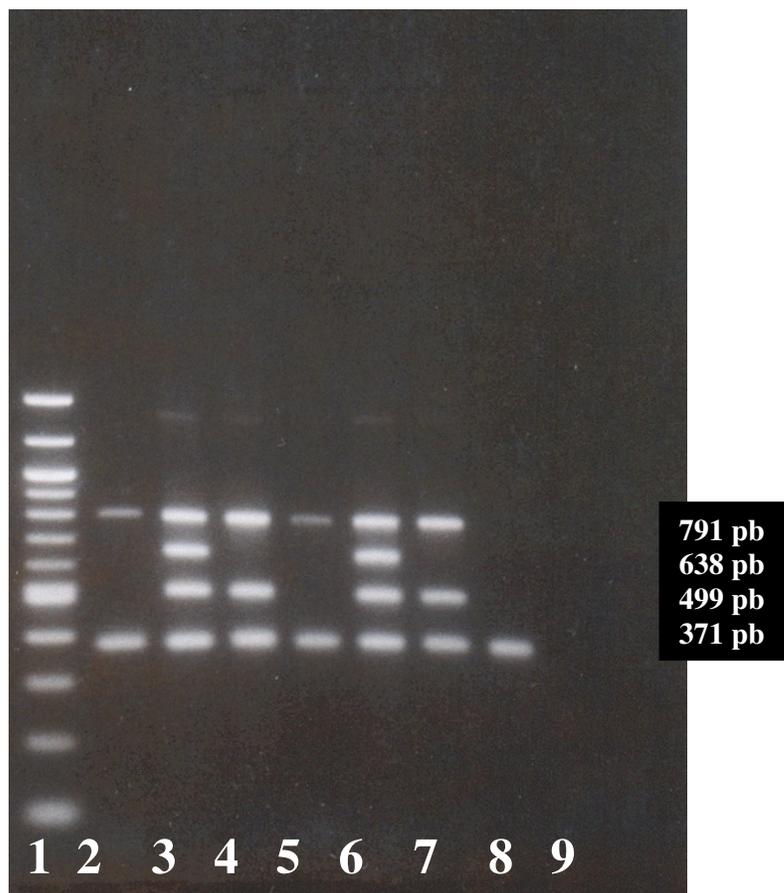


Figura 7. Foto do gel contendo as amostras amplificadas com os iniciadores específicos para as espécies de *Staphylococcus* e o gene *mecA*. Linha 1- padrão de peso molecular de 100 bp ladder; 2- controle positivo com DNA de *S. epidermidis* ATCC 14579; 3- controle positivo com DNA de MRSA USA 100; 4- controle positivo com DNA de MRSE HC 687; 5- amostra de biofilme subgingival positiva para *S. epidermidis*; 6- amostra de biofilme subgingival positiva para MRSA; 7- amostra de biofilme subgingival positiva para MRSE; 8- amostra de biofilme subgingival positiva somente para o 16S bacteriano; 9- controle negativo.

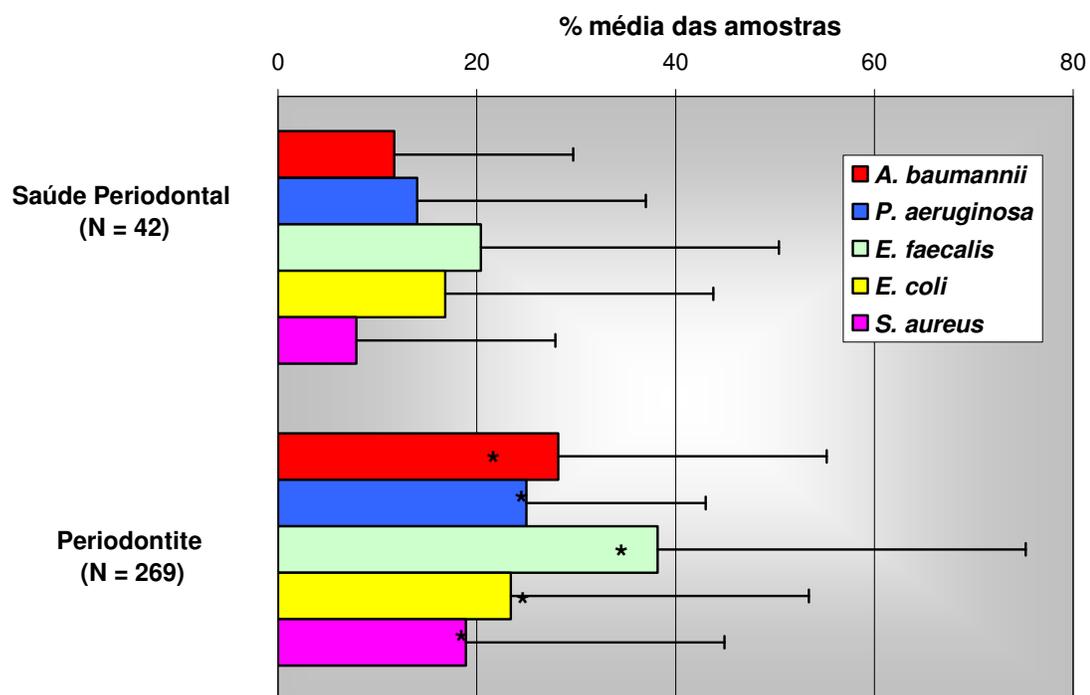


Figura 8. Prevalência das espécies bacterianas no biofilme subgingival dos diferentes grupos clínicos avaliados pelo método do checkerboard. * Refere-se ao Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

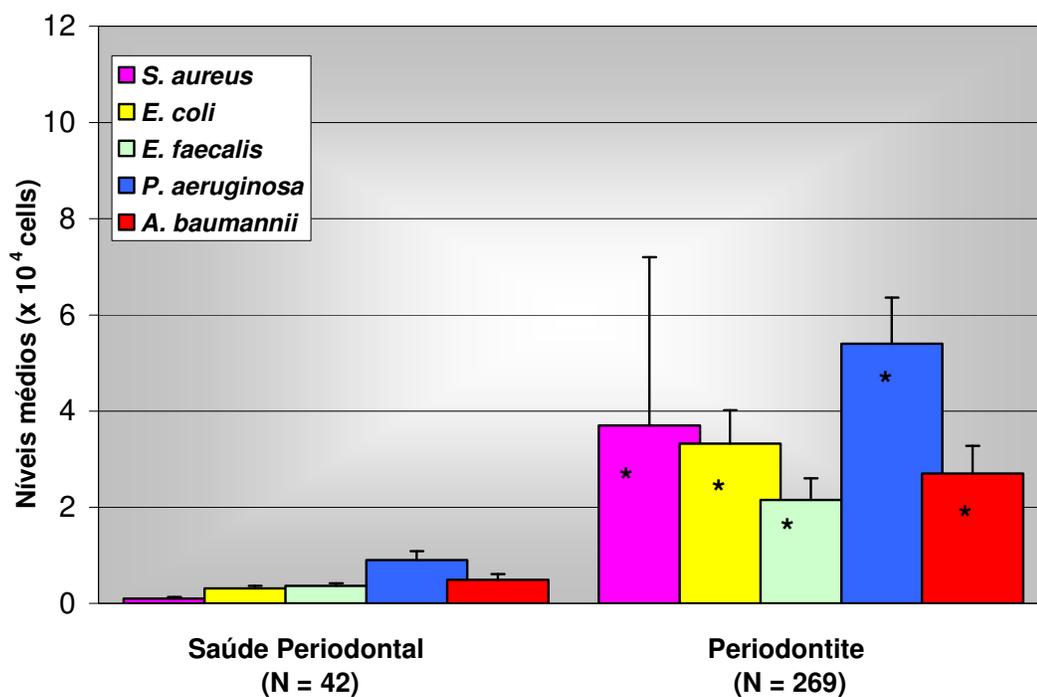


Figura 9. Níveis médios das espécies bacterianas no biofilme subgingival dos diferentes grupos clínicos avaliados pelo método do checkerboard. * Refere-se ao Teste de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

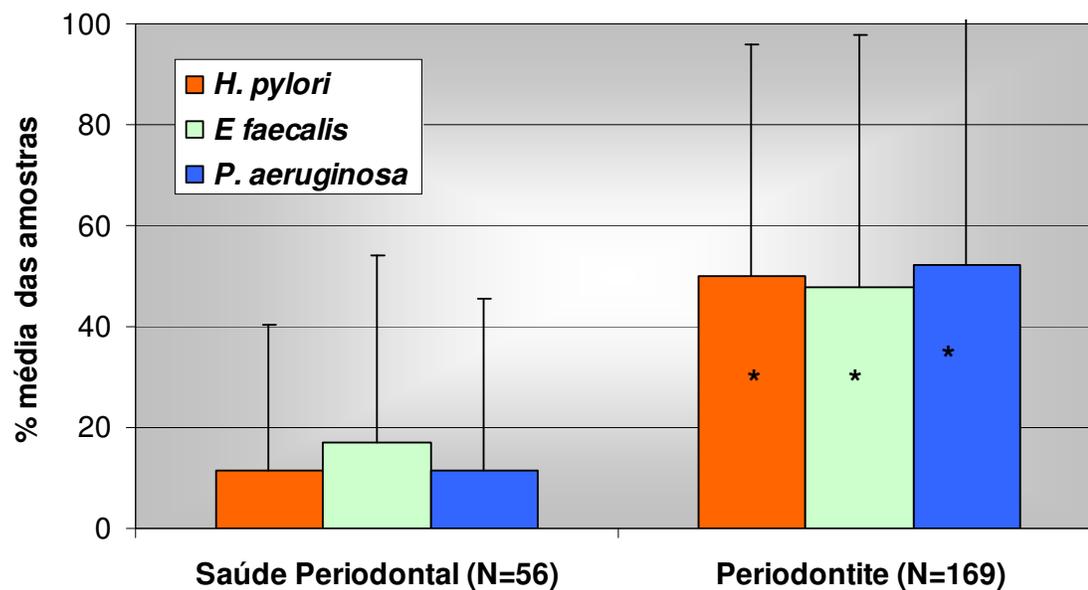


Figura 10. Frequência média de detecção das espécies *H. pylori*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em amostras de biofilme subgingival de indivíduos saudáveis (n=56) e de pacientes com periodontite (n = 169) através de PCR. * Refere-se ao teste de Mann-Whitney ($p < 0,01$).

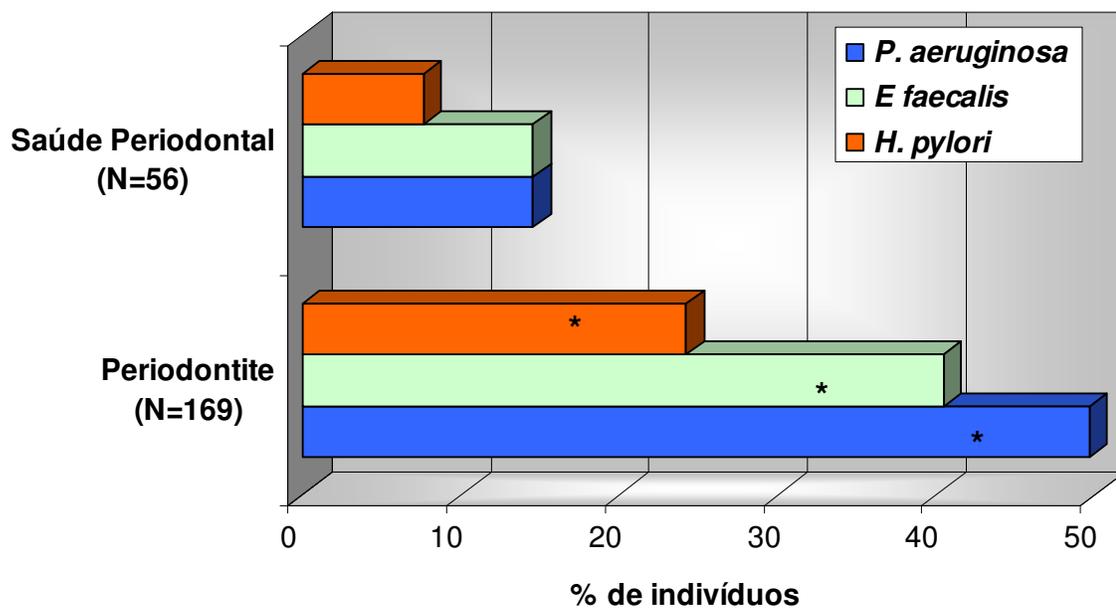


Figura 11: Frequência de detecção das espécies *H. pylori*, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* em amostras de saliva de indivíduos saudáveis (n=56) e de pacientes com periodontite (n = 169) através de PCR. *Refere-se ao teste exato de Fischer ($p < 0,01$).

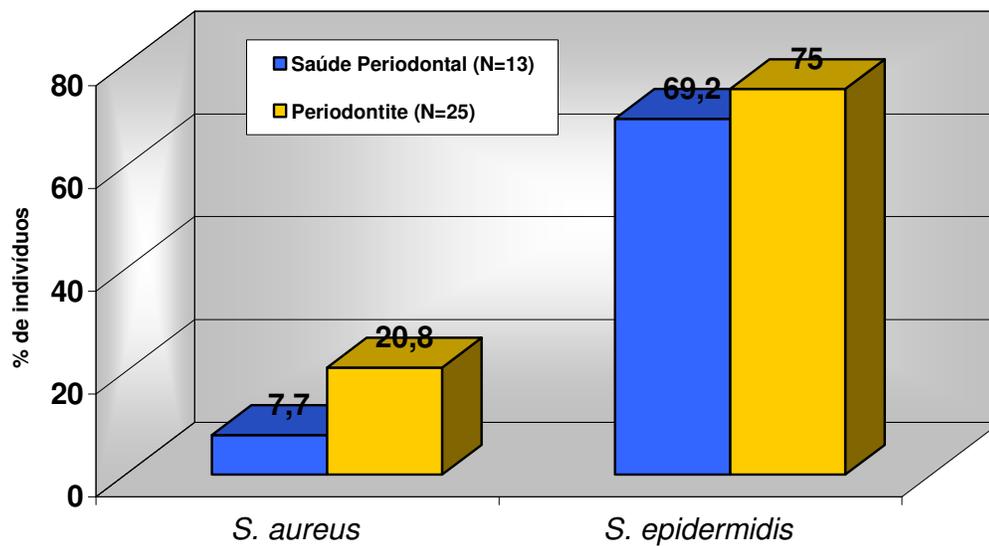


Figura 12. Frequência de detecção de *S. aureus* e *S. epidermidis* nos isolados de indivíduos saudáveis (n = 13) e de pacientes com periodontite (n = 25).

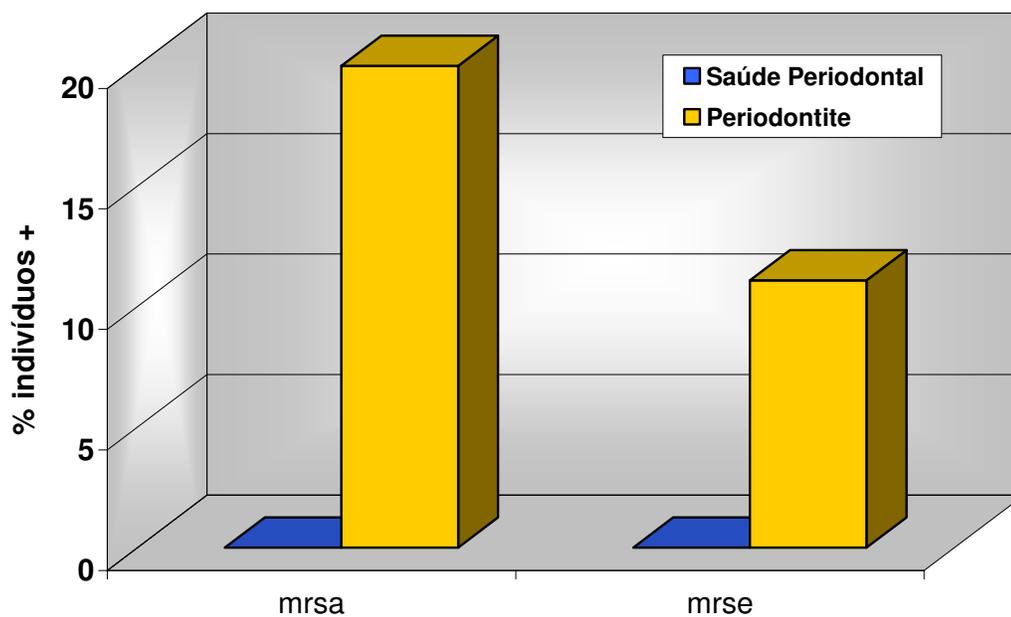


Figura 13. Frequência de detecção de *S. aureus* (MRSA) e *S. epidermidis* (MRSE) carreadores do gene *mecA* entre as amostras bacterianas isoladas de indivíduos com periodontite e saúde periodontal.

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, vários estudos têm focado nas associações entre doenças periodontais e bactérias orais com doenças sistêmicas (REDDY, 2007). Do mesmo modo, tem sido crescente o interesse pela busca de espécies patogênicas de importância médica na cavidade oral (SLOTS, FEIK & RAMS, 1990; COLOMBO *et al.*, 2002, SOUTO *et al.*, 2006). Em particular, a presença de doença periodontal parece favorecer a colonização por esses microorganismos. Assim, o presente estudo avaliou a presença de sete espécies patogênicas não orais (*A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *H. pylori*) em amostras de saliva e biofilme subgingival de pacientes com periodontite e saúde periodontal através dos métodos do Checkerboard, PCR e cultura. As espécies testadas pelo checkerboard, *A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, foram detectadas em prevalência e níveis significativamente maiores em amostras de biofilme subgingival de pacientes com periodontite do que de pacientes com saúde periodontal. Resultados semelhantes foram reportados por outros autores (SLOTS *et al.*, 1991; ALI *et al.*, 1996; COLOMBO *et al.*, 2002; SOUTO *et al.*, 2006). O papel dessas espécies não orais na patogênese das doenças periodontais não é totalmente compreendido. Entretanto, estes dados sugerem que bolsas periodontais podem funcionar como reservatórios para esses microorganismos, principalmente quando estes se encontram em altos níveis, e como fonte de disseminação para outras partes do organismo.

A. baumannii é um dos principais agentes etiológicos de infecções nosocomiais. Essa espécie também foi detectada em alta frequência em pacientes com periodontite refratária, ou seja, que não respondem favoravelmente à terapia periodontal mecânica associada à antibioticoterapia (COLOMBO *et al.*, 1998). Visto que essa espécie é resistente a diversos

antimicrobianos, sua alta prevalência na periodontite refratária pode ser justificada pela freqüente utilização de antibióticos no tratamento dessa doença.

A espécie bacteriana mais freqüentemente detectada nas amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite avaliadas pela técnica de checkerboard foi o *E. faecalis* (38,2%). Sua prevalência foi maior quando determinada pela técnica de PCR (47,8%). *E. faecalis* também foi detectado em 40,5% das amostras de saliva de pacientes com periodontite. *E. faecalis* tem sido isolada de pacientes com infecção endodôntica (SIQUEIRA et al., 2002), particularmente de infecções persistentes e casos de insucesso terapêutico (SUNDQVIST et al., 1998; RÔÇAS, SIQUEIRA & SANTOS, 2004; ZOLETTI, SIQUEIRA & SANTOS, 2006), bem como de lesões da mucosa oral em pacientes imunocomprometidos. (WAHLIN & HOLM, 1988). Dados na literatura correlacionando infecção periodontal e colonização por *E. faecalis* são limitados. Em geral, a prevalência desta espécie parece aumentar em proporções em indivíduos com periodontite (COLOMBO et al., 2002; SEDGLEY, LENNAN & CLEWELL, 2004; SOUTO et al., 2006). Por outro lado, Rams e colaboradores (1992) detectaram *E. faecalis* em apenas 1% dos pacientes com periodontite de acometimento precoce e 5,1% de pacientes com periodontite crônica por métodos de cultura. Significantes associações entre as medidas clínicas de destruição e inflamação periodontal (PBS, NCI, SAS e BS) e a presença de *E. faecalis* também foram observadas no presente estudo. Esses resultados sugerem que esta espécie pode contribuir para a gravidade e/ou progressão da doença periodontal. De fato, *Enterococcus* orais produzem vários fatores de virulência relevantes para a patogênese da doença periodontal (HOLT & BRAMANTI, 1991; SOCRANSKY & HAFFAJEE, 1991), incluindo elastase extracelular (NORD & WADSTRÖM, 1973), proteases (NORD & WADSTRÖM, 1973) e hemolisinas (NORD & WADSTRÖM, 1973; NOVAK, HOLZER & LIBERIN, 1988). Além disso, *E. faecalis* pode ter sua patogenicidade aumentada em infecções mistas com bactérias anaeróbias (BROOK,

1988), e é capaz de induzir periodontite experimental em combinação com bactérias orais (DAHLÉN *et al.*, 1982; FABRICIUS *et al.*, 1982). A presença de *E. faecalis* em lesões periodontais pode ter implicações terapêuticas importantes. *Enterococcus* provenientes das bolsas periodontais podem disseminar pela corrente sanguínea e ocasionar septicemias fatais em indivíduos imunocomprometidos (BERGMANN, 1988). Beta-lactamases produzidas por *Enterococcus* também podem diminuir a eficácia das penicilinas no tratamento das periodontites (MURRAY, CHURCH & WANGER, 1986). Estudos *in vitro* têm demonstrado a habilidade do *E. faecalis* na inativação do metronidazol (NAGY & FÖLDES, 1991). Assim, bactérias anaeróbias em infecções mistas com *E. faecalis* podem se tornar de 4 a 8 vezes mais resistentes ao metronidazol (NAGY, WERNER & HEIZMANN, 1990).

A espécie bacteriana encontrada em maior quantidade nas 311 amostras de biofilme subgingival avaliadas pelo checkerboard foi *P. aeruginosa* ($3,15 \times 10^4$ células). Já sua prevalência foi de aproximadamente 20%. Pelo método da PCR, essa prevalência foi cerca de 32% nas amostras de biofilme e saliva. Na presença de periodontite, esses valores variaram de 25% (checkerboard) a 52% (PCR). Muitos trabalhos têm documentado a presença de espécies de *Pseudomonas* e enterobactérias em pacientes com doença periodontal (SLOTS, RAMS & LITSGARTEN, 1988; SLOTS, FEIK & RAMS, 1990; SLOTS *et al.*, 1991; ALI *et al.*, 1994; 1996). No entanto, essa prevalência pode variar de 14%, como observado em pacientes com periodontite dos Estados Unidos (SLOTS, FEIK & RAMS, 1990), a 61,1% em pacientes da Romênia (ALI *et al.*, 1996). Em um estudo realizado na população brasileira, espécies de *Pseudomonas* foram detectadas em 12,5% e as enterobactérias em 20% das amostras avaliadas (BARBOSA *et al.*, 2001). A espécie *P. aeruginosa* foi encontrada em 36% dos isolados (BARBOSA *et al.*, 2001). A alta prevalência em algumas populações pode ser ocasionada pela ingestão de água ou alimentos contaminados, higiene inadequada e uso indiscriminado de antibióticos, o que levaria ao super crescimento ou colonização na área

subgingival (SLOTS *et al.*, 1991; ALI *et al.*, 1994;). Também foi demonstrada uma prevalência de 10,2% em pacientes com periodontite refratária (SLOTS, RAMS & LITSGARTEN, 1988). Enterobactérias e espécies de *Pseudomonas* são menos susceptíveis à ação da clorexidina, bem como ao debridamento mecânico e cirurgia periodontais do que os microorganismos encontrados na cavidade oral (SLOTS, RAMS & LITSGARTEN, 1988; SLOTS *et al.*, 1991). Essas espécies também apresentam resistência a muitos antibióticos, inclusive a aqueles comumente utilizados no tratamento da periodontite refratária, como a amoxicilina, tetraciclina e o metronidazol (SLOTS, FEIK & RAMS, 1990). *P. aeruginosa* possui vários fatores de virulência que podem contribuir para a progressão da doença periodontal (SLOTS, RAMS & LITSGARTEN, 1988), isto é, é um microorganismo invasor de tecidos (BODEY *et al.*, 1983) e produz leucotoxinas extracelulares (POLLACK & ANDERSON, 1978; BALTCH *et al.*, 1985).

O patógeno *S. aureus* foi detectado em aproximadamente 14% das amostras de biofilme subgingival examinadas pelo método do checkerboard, sendo 19% em pacientes com periodontite. Seus níveis também foram bastante elevados no grupo com doença periodontal ($3,7 \times 10^4$ células). Quando espécies de *Staphylococcus* foram isoladas das amostras de biofilme subgingival, a grande maioria das amostras isoladas de pacientes com periodontite como dos pacientes controles era *S. epidermidis* (75% e 69,2%, respectivamente). A espécie *S. aureus* foi detectada em 20,8% das amostras isoladas de pacientes com periodontite e em 7,7% dos pacientes com saúde periodontal. Em relação às espécies de *Staphylococcus*, há uma grande controvérsia se estas espécies são membros residentes da microbiota oral. Poucos são os estudos que avaliaram o papel dessas espécies na saúde ou doenças orais. Em uma elegante revisão, Smith, Jackson e Bagg (2001) reportaram que o *S. aureus* e os *Staphylococcus* coagulase-negativos têm sido isolados tanto de biofilme dental supragengival, como de biofilme subgingival (RAMS, BABALOLA & SLOTS, 1990;

DAHLEN & WIKSTROM, 1995; PIOCHI & ZELANT, 1995; KAMMA, NAKOU & BACHNI, 1999) e próteses dentárias de indivíduos com saúde ou infecção oral. Estudos têm demonstrado que a frequência de espécies do gênero *Staphylococcus* na cavidade oral pode variar de acordo com a condição oral. Em adultos saudáveis, a prevalência dessas espécies tem variado de 17% a 100% (PERCIVAL, CHALLACOMBE & MARSH, 1991; KIM, YOU & KIM, 1995; JACKSON *et al.*, 1999), sendo *S. aureus* detectado em 24-36% dos indivíduos. O uso de próteses dentárias parece favorecer a colonização por *S. aureus*. Altas proporções de *Staphylococcus* também têm sido reportadas em diversas infecções orais, incluindo mucosite, queilite angular, gengivite, periodontites e perimplantites (DAHLEN *et al.*, 1982; THEILADE, BUDTZ-JORGENSEN & THEILADE, 1983; THEILADE & BUDTZ-JORGENSEN, 1988). Em crianças, a prevalência de *Staphylococcus* na cavidade oral variou de 64-84%, sendo 33% de *S. aureus* (MIYAKE *et al.*, 1991). Esses autores observaram que 19% dos isolados produziam toxina exfoliativa e 40% produziam enterotoxinas. Espécies de estafilococos também podem disseminar da cavidade oral para outras partes distantes do organismo, causando infecções sérias nesses sítios, especialmente em pacientes debilitados. Por exemplo, especula-se que, em pacientes com artrite reumatóide, a alta incidência de infecções estafilocócicas nas articulações ou próteses pode estar associada à disseminação dessas espécies da cavidade oral para esses sítios, visto que esses pacientes apresentam uma grande prevalência de estafilococos na cavidade oral (SMITH, JACKSON & BAGG, 2001). No presente estudo, 20% das amostras de *S. aureus*, e 11,1% das amostras de *S. epidermidis* carregavam o gene *mecA*. O carregamento oral de *S. aureus* meticilina-resistente (MRSA) tem sido reportado (MARTIN & HARDY, 1991; OWEN, 1994; TAWARA, HONMA & NAITO, 1996; ROSSI *et al.*, 1997), o que pode implicar em re-colonização para outros sítios do organismo ou infecção cruzada para outros indivíduos. Essas espécies resistentes são extremamente difíceis de serem erradicadas da região de orofaringe de pacientes ou membros

da equipe hospitalar, necessitando da combinação de antimicrobianos sistêmicos e tópicos, além do uso tópico de clorexidina (LESSIN, JORDENS & BOWLER, 1996). Logo, devem-se considerar também métodos preventivos e terapêuticos para eliminação dessa espécie da cavidade oral desses indivíduos. Em pacientes mais idosos e usuários de prótese, observou-se que *S. aureus* meticilina-resistente foi detectado em 10% dos casos, não sendo eliminado com agentes de limpeza normalmente utilizados para próteses dentárias. A eliminação de MRSA desses indivíduos só foi eficiente após esterilização da prótese ou reconstrução de nova prótese (TAWARA, HONMA & NAITO, 1996; ROSSI *et al.*, 1997). Ainda mais preocupante é a relativa alta prevalência de cepas MRSA na cavidade oral de crianças, o que tem levado a questionamento se esta espécie é um membro transitório da microbiota ou um colonizador residente do habitat oral (SMITH, JACKSON & BAGG, 2001). Infelizmente, poucos trabalhos têm focado no papel da cavidade oral como reservatório e fonte de infecções por MRSA na comunidade ou ambientes hospitalares.

Muitos estudos têm sugerido a cavidade oral como um reservatório para *H. pylori*, e que a falha na eliminação dessa espécie da boca pode levar à re-colonização e re-infecção do estômago (SHAMES *et al.*, 1989; FERGUSON *et al.*, 1993; MAPSTONE *et al.*, 1993; NGUYEN *et al.*, 1993; NGUYEN, EL-ZAATARI & GRAHAM, 1995; OSHOWO *et al.*, 1998; MIYABAYASHI *et al.*, 2000; SONG *et al.*, 2000; AVCU *et al.*, 2001). Outros autores acreditam que essa bactéria seja apenas transiente no ambiente oral (ASIKAINEN, CHEN & SLOTS, 1994; CAMMAROTA *et al.*, 1996; OKUDA *et al.*, 2000; OLIVIER *et al.*, 2006). É possível que a presença de *H. pylori* na cavidade oral seja afetada pela presença de infecção oral (DYE, KRUSZON-MORAN & MC QUILAN, 2002). A avaliação da presença de *H. pylori* na saliva e biofilme subgengival da população estudada foi realizada somente através da técnica de PCR. Nossos resultados estão em concordância com os dados da literatura que demonstram a presença de *H. pylori* em diferentes amostras clínicas da cavidade oral,

particularmente no biofilme subgengival de pacientes com periodontite (NGUYEN *et al.*, 1993; UMEDA *et al.*, 1993; RIGGIO & LENNON, 1999; DYE, KRUSZON-MORAN & MC QUILAN, 2002, GEBARA *et al.*, 2004; 2006). A espécie *H. pylori* foi detectada em 24% de todas as amostras analisadas. Sua maior prevalência foi encontrada no biofilme subgengival (33,3%) em comparação com a saliva (20%). Essa diferença foi ainda mais significativa no grupo de pacientes com periodontite (saliva = 23.5% X biofilme subgengival = 50%). A microbiota salivar representa predominantemente a microbiota da língua. Por outro lado, os biofilmes supra e subgengivais são semelhantes entre si em composição, mas distintos das microbiotas salivar e das mucosas orais (MAGER *et al.*, 2003). Logo, a baixa prevalência de *H. pylori* observada na saliva comparada ao biofilme subgengival sugere que essa espécie prefere o ambiente subgengival para colonização ao invés de outros nichos da cavidade oral. De fato, Oshowo e colaboradores (1998) não detectaram essa espécie em nenhuma amostra de saliva examinada. Outros investigadores reportaram freqüências similares aos nossos resultados, ou seja, 10% a 23% de *H. pylori* na saliva (GEBARA *et al.*, 2004; 2006). Em contraste com esses dados, Song e colaboradores (2000) detectaram essa espécie em 55% das amostras de saliva, porém o *status* periodontal dos pacientes não foi descrito. A complexidade e diversidade da microbiota juntamente ao processo inflamatório proporcionam uma grande variedade de nutrientes e sítios de ligação para o estabelecimento desse microorganismo. A metodologia de cultura, os ensaios imunológicos e a utilização de métodos moleculares têm demonstrado que certas espécies encontram-se freqüentemente associadas entre si, formando complexos microbianos específicos no biofilme subgengival (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Espécies geneticamente relacionadas ao *H. pylori*, tais como *Campylobacter* spp. juntamente com espécies de *Prevotella* e *Fusobacterium* formam o complexo laranja, o qual precede a colonização pelo complexo vermelho, composto pelos patógenos periodontais *P. gingivalis*, *T. denticola* e *T. forsythia* (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Esses dois complexos aumentam em

prevalência e níveis em sítios com bolsas periodontais profundas, perda de inserção e sangramento à sondagem, estando associados com inflamação e destruição periodontais (SOCRANSKY *et al.*, 1998). Logo, espécies dentro do biofilme subgingival estabelecem inter-relações bastante complexas entre si e com o hospedeiro (KOLENBRANDER & LONDON, 1993). Por exemplo, Andersen, Ganeshukmar e Kolenbrander (1998) reportaram que as espécies *F. nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum* e *P. gingivalis*, membros dos complexos vermelho e laranja, co-agregam com *H. pylori*. *Fusobacterium* spp. têm sido descritos como microorganismos-chave no processo de co-agregação entre diferentes gêneros de bactérias facultativas precursoras na formação do biofilme dental, e espécies anaeróbias estritas, os colonizadores tardios (KOLENBRANDER & LONDON, 1993). Essas espécies produzem vários metabólitos, como o formato e fumarato, que são usados como fonte de energia por espécies de *Campylobacter* e *Wollinella* (PASTER & GIBBONS, 1986). Assim, a colonização por *Fusobacterium* pode favorecer o estabelecimento de *H. pylori* no meio ambiente subgingival. Além disso, o biofilme subgingival pode fornecer grandes quantidades de uréia, a qual pode selecionar espécies produtoras de urease, como o *H. pylori*. Relações antagonistas também podem ocorrer no biofilme subgingival. Okuda e colaboradores (2003) observaram que *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* produzem bacteriocinas contra *H. pylori*. Logo, o fato de indivíduos com boa higiene oral apresentarem menos *H. pylori* na cavidade oral poderia ser justificado pela ação inibitória dos colonizadores iniciais do biofilme dental, os estreptococos orais, sobre *H. pylori*. É importante ressaltar que um dos objetivos do presente trabalho foi determinar se a cavidade oral poderia ser um reservatório de *H. pylori*, independentemente da presença de infecção gástrica. Por isso, os pacientes avaliados neste estudo não apresentavam história prévia de infecção gástrica em contraste com a maioria dos estudos reportados na literatura (FERGUSON *et al.*, 1993; GENTA,

HAMMER & GRAHAM, 1993; MIYABAYASHI *et al.*, 2000; GEBARA *et al.*, 2004). Berroteran e colaboradores (2002) detectaram *H. pylori* no biofilme de 15% de pacientes assintomáticos, enquanto Martinez-Gomes e colaboradores (2006) não encontraram essa espécie em nenhum dos 10 pacientes assintomáticos avaliados. Nós observamos uma prevalência bem mais alta (24%) em nossa população assintomática. Por outro lado, Olivier e colaboradores (2006) não detectaram *H. pylori* em amostras orais de indivíduos sem periodontite, porém portadores de infecção gástrica por essa bactéria. Um dado interessante foi reportado por Umeda e colaboradores (2003), os quais demonstraram que um paciente com bolsas periodontais reteve *H. pylori* na cavidade oral mesmo após a erradicação deste no estômago. Do mesmo modo, Gebara e colaboradores (2004) reportaram que 60% dos pacientes com doença periodontal foram positivos para DNA de *H. pylori* na cavidade oral, enquanto apenas 10% foram positivos no estômago após terapia tripla com antimicrobianos. Estes achados sugerem que o carreamento desta espécie na cavidade oral não parece estar associado a sua presença no estômago, mas sim à existência de infecção periodontal.

Diferenças na detecção de espécies patogênicas não comumente associadas à cavidade oral observadas na literatura podem resultar de diferenças na população estudada, na condição de saúde oral, tipo e número de amostras clínicas avaliadas e dos métodos de detecção. Um aspecto que deve ser sempre considerado nesses estudos clínicos e microbiológicos são os critérios de definição e classificação da doença periodontal (VAN DER VELDEN, 2005). Como tem sido sugerido, neste estudo foi realizado o exame periodontal completo (mensuração de 6 sítios por dente) para uma determinação mais precisa da doença ou saúde periodontal (PAPAPANOU, 1996). Os resultados deste trabalho demonstraram uma destruição de moderada a avançada nos grupos com periodontite. Além disso, um grande número de amostras/indivíduos foi avaliado no presente trabalho em relação a outros estudos (DAHLEN *et al.*, 1982; SLOTS, RAMS & LITSGARTEN, 1988; RAMS, BABALOLA &

SLOTS, 1990; SLOTS *et al.*, 1991; RAMS *et al.*, 1992; ALI *et al.*, 1994; 1996; DAHLEN & WIKSTROM, 1995; PIOCHI & ZELANT, 1995; KAMMA, NAKOU & BACHNI, 1999; RIGGIO & LENNON, 1999; BARBOSA *et al.*, 2001; SEDGLEY, LENNAN & CLEWELL, 2004; GEBARA *et al.*, 2004; 2006).

Tanto a doença periodontal, como as infecções causadas pelos patógenos investigados neste estudo podem ser influenciadas por fatores como idade e sexo. Nenhuma correlação foi observada entre a presença dessas bactérias e sexo. Em geral, a frequência desses microorganismos apresentou uma tendência a aumentar com a idade, porém somente *H. pylori* teve uma associação significativa, ainda que pouco expressiva, com este parâmetro. Em um estudo epidemiológico, Dye, Kruszon-Moran e Mc Quillan (2002) encontraram uma correlação significativa entre a prevalência de *H. pylori* e doença periodontal avançada, mesmo após ajuste para todos esses fatores demográficos.

Em relação às metodologias, estudos têm demonstrado que métodos de biologia molecular são mais efetivos que a cultura convencional na detecção de espécies patogênicas, principalmente nos casos de microorganismos fastidiosos, de difícil cultivo e/ou com características fenotípicas muito variáveis (LOESCHE *et al.*, 1992; RIGGIO *et al.*, 1996; PAPAPANOU *et al.*, 1997; TANG *et al.*, 1998; PAULE, TRICK & TENNOVER, 2003; LLEO *et al.*, 2005; PETTI, POLAGE & SCHREKENBERGER, 2005). Em geral, uma maior frequência das espécies bacterianas aqui avaliadas foi observada em comparação com estudos que utilizaram cultura (FERGUSON *et al.*, 1993; DAHLEN & WIKSTROM, 1995; BARBOSA *et al.*, 2001; SEDGLEY, LENNAN & CLEWELL, 2004). Uma possível explicação para essas diferenças é a habilidade de métodos moleculares em detectar DNA de células bacterianas não viáveis. No entanto, é muito improvável que o DNA de células não viáveis possa se manter intacto em um ambiente complexo como o biofilme subgingival ou saliva por muito tempo (ROBERTS & MULLANY, 2006). Após a morte celular, a molécula

de DNA sofre rapidamente a ação de nucleases de outras bactérias e fungos do ambiente oral. Portanto, essas diferenças estão mais relacionadas a outros fatores, como a maior sensibilidade dos métodos moleculares, particularmente o PCR. Este método ainda resultou em prevalências maiores de *P. aeruginosa* e *E. faecalis* em amostras de pacientes com periodontite do que o método do checkerboard. Entretanto, a concordância das duas técnicas não foi examinada estatisticamente porque as amostras e populações de indivíduos avaliadas não foram as mesmas. A prevalência de *S. aureus* nos pacientes com periodontite foi semelhante pelos dois métodos. Deve-se ressaltar, porém, que o PCR foi realizado em amostras clínicas de *Staphylococcus*, e não diretamente nas amostras de biofilme subgingival. O PCR é um método extremamente dependente dos iniciadores utilizados. Todos os protocolos de PCR aqui empregados foram otimizados e reportados na literatura (DE VOS *et al.*, 1997; MASON *et al.*, 2001; GEBARA *et al.*, 2004; RÖÇAS, SIQUEIRA & SANTOS, 2004). Em relação à técnica do checkerboard, uma preocupação na interpretação dos dados seria a respeito da sensibilidade e especificidade das sondas de DNA empregadas. A sensibilidade do ensaio foi ajustada para 10^4 células de cada espécie através do ajuste da concentração de cada sonda na solução de hibridização. Previamente ao seu uso, as sondas de DNA foram testadas contra uma bateria de 47 espécies orais e não orais em diferentes concentrações a fim de se avaliar a especificidade das mesmas. Concluiu-se que quando as reações cruzadas aconteciam, na maioria das vezes, eram entre bactérias de um mesmo gênero ou entre espécies relacionadas e eram bastante limitadas. Quando analisamos as intensidades dos sinais, observamos que as reações cruzadas ocorreram numa razão de 1/100 ou 1/1000 entre a cepa homóloga e heteróloga. Por exemplo, o sinal produzido pela hibridização da sonda de *E. coli* com 10^5 células da mesma cepa equivalia à intensidade de um sinal resultante da hibridização desta sonda com 10^7 células de *Klebsiella pneumoniae* (uma das cepas testadas). É possível que reações cruzadas com espécies do mesmo gênero, porém ainda não

identificadas ou não cultiváveis ocorram no biofilme subgengival. Isso resultaria em uma maior prevalência e aparecimento de resultados falso-positivos. Entretanto, deve-se ressaltar que as prevalências das espécies bacterianas aqui avaliadas foram maiores pelo método do PCR do que pelo checkerboard. Além disso, quando a cultura foi utilizada para o *S. aureus*, por exemplo, frequências similares foram observadas tanto com o PCR como com o checkerboard. Uma vantagem da técnica do checkerboard foi a identificação simultânea de vários microorganismos em um número grande de amostras de biofilme subgengival. Métodos tradicionais de cultura e identificação inviabilizariam este trabalho, devido ao alto custo e tempo requeridos por essas técnicas, subestimando muitas vezes a prevalência dessas bactérias (LOESCHE *et al.*, 1992; PAPAPANOU *et al.*, 1997). Outra característica desta técnica é a possibilidade de semi-quantificação das espécies detectadas nas amostras. Por exemplo, a prevalência de *E. faecalis* foi maior do que *P. aeruginosa* em pacientes com periodontite, mas os níveis de *P. aeruginosa* foram bem mais elevados do que de *E. faecalis* nesses mesmos pacientes (Figuras 8 e 9). Ainda em relação a questões metodológicas, muitos trabalhos reportam somente a presença ou ausência dessas espécies através da utilização de meios seletivos, o que torna difícil a comparação de resultados entre grupos de pacientes. A maioria dos dados está relacionada a amostras de raspado de bochecha e saliva, com informação insuficiente em relação às amostras de biofilme dental, devido à grande dificuldade na coleta e processamento dessas amostras.

A grande diversidade de superfícies na cavidade oral fornece inúmeros sítios ecológicos para colonização com uma grande variedade de microorganismos, incluindo espécies patogênicas de importância médica (MAGER *et al.*, 2003). Na presença de infecção periodontal, o estabelecimento destas espécies parece ser favorecido pela presença de uma microbiota oral subgengival complexa e inflamação periodontal (SOCRANSCKY *et al.*, 1998). O atual conhecimento do papel desses microorganismos patogênicos na microbiota

oral de pacientes com periodontite e saúde periodontal, bem como no risco ao desenvolvimento de infecções sistêmicas ainda é incompleto. Entretanto, sabe-se, por exemplo, que quando essas espécies crescem em biofilme, como o biofilme subgengival, tendem a ser menos susceptíveis à ação dos antimicrobianos e ao sistema imune, resultando no surgimento de focos de infecção e re-infecção e insucesso terapêutico (SMITH, JACKSON & BAGG, 2001). Logo, estudos longitudinais futuros são necessários para saber se a presença destes patógenos é transiente ou permanente. Esses trabalhos poderão orientar clínicos e pesquisadores quanto à prevenção do carreamento oral desses microorganismos patogênicos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e terapêuticas que diminuirão o risco de disseminação e infecções sistêmicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Mais ainda, reforçarão a importância dos cuidados com a manutenção da saúde periodontal.

Os resultados do presente trabalho reforçam o conceito da cavidade oral como reservatório de microorganismos patogênicos de importância médica, especificamente *A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *H. pylori*. Em particular, a prevalência dessas espécies mostrou uma marcante associação com a presença de infecção periodontal.

6. CONCLUSÕES

Em geral, todas as espécies patogênicas investigadas (*A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *H. pylori*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* e *S. aureus*) foram detectadas com relativa frequência na microbiota oral da população avaliada neste estudo.

- ❖ As espécies bacterianas *A. baumannii*, *E. coli*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* avaliadas pela hibridização com sondas genômicas de DNA e a metodologia do Checkerboard apresentaram uma alta prevalência e níveis elevados em amostras de biofilme subgengival de pacientes com periodontite em relação aos indivíduos com saúde oral;
- ❖ As espécies *E. faecalis*, *H. pylori* e *P. aeruginosa* analisadas pelo PCR foram significativamente mais prevalentes na saliva e biofilme subgengival de pacientes com periodontite em comparação aos indivíduos com saúde periodontal;
- ❖ Na metodologia de cultura, a espécie mais isolada do biofilme subgengival dos dois grupos clínicos avaliados foi *S. epidermidis*. A espécie *S. aureus* foi mais isolada de pacientes com periodontite em relação aos controles. Tanto *S. epidermidis* como *S. aureus* carreadores do gene *mecA* foram isolados somente em pacientes com periodontite;
- ❖ Todas as espécies avaliadas no presente estudo apresentaram correlação positiva com os parâmetros clínicos de inflamação e destruição periodontais, sugerindo um possível papel na progressão da doença periodontal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANDAR, J. M. 1990. A 6 year study on the pattern of periodontal disease progression. J. Clin. Periodontol. **17**: 467-471.

ALI, R. W., BAKKEN, V., NILSEN, R. & SKAUG, N. 1994. Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. J. Periodontol. **65**: 1046-1052.

ALI, R. W. C., VELCESCU, M. C., JIVANESCU, B., LOFTHUS, B. & SKAUG, N. 1996. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. J. Clin. Periodontol. **18**: 411-415.

ANDERSEN, R. N., GANESHKUMAR, N. & KOLENBRANDER, P. E. 1998. *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium spp.* Oral Microbiol. Immunol. **13**: 51-54.

ARMITAGE, G. C. 1999. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. Ann. Periodontol. **4**: 1-7.

ASHIMOTO, A.C.C., BAKKER, I. & SLOTS, J. 1996. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. Oral Microbiol. Immunol. **11**: 266-273.

ASIKAINEN, S. & ALALUUSUA, S. 1993. Bacteriology of dental infections. Eur. Heart J. **14**: 43-47.

ASIKAINEN, S., CHEN, C. & SLOTS, J. 1994. Absence of *Helicobacter pylori* in subgingival samples determined by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.* **9**: 318-320.

AVCU, N., AVCU, F., BEYAN, C., URAL, A., KAPTAN, K. & OZYURT M. 2001. The relationship between gastric-oral *Helicobacter pylori* and oral hygiene in patients with vitamin B-12 deficiency anemia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **92**: 166-169.

BALTCH, A. L., HAMMER, M. C., SMITH, R. P., OBRIG, T. G., CONROY, J. V. & BISHOP, M. B. 1985. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin on human serum and granulocytes and their microbicidal, phagocytic, and chemotactic functions. *Infect. Immun.* **48**: 498-506.

BARBOSA, F. C. B., MAYER, M. P. A., SABA-CHUIFI, E. & CAI, S. 2001. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonads from brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.* **16**: 306-310.

BAYLISS, R. 1983. The teeth and infective endocarditis. *Br. Heart J.* **67**: 506-510.

BERGMANN, O. J. 1988. Oral infections and septicemia in immuno-compromised patients with hematologic malignancies. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2105-2109.

BERROTERAN, A., PERRONE, M., CORRENTI, M., CAVAZZA, M. E., TOMBAZZI, C. & LECUNA, V. 2002. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *J. Med. Microbiol.* **51**: 764-770.

BODEY, G. P., BOLIVAR, R., FAISTAIN, V. & JADELA, L. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Dis.* **5**: 279-313.

BONTEN, M. J., GAILLARD, C. A., VAN TIEL, F. H., SMEETS, H. G., VAN DER GEEST, S. & STOBBERINGH, E. E. 1994. The stomach is not a source for colonization of the upper respiratory tract and pneumonia in ICU patients. *Chest.* **105**: 878-882.

BOWDEN, G. H. W., ELWOOD D. C. & HAMILTON I. E. 1979. Microbial ecology of the oral cavity. p.135-217. In Alexander, M. (ed.). *Advances in microbial ecology*. Plenum Publishing. New York, NY.

BROOK, I. 1988. Effect of *Streptococcus faecalis* on the growth of *Bacteroides* species and anaerobic cocci in mixed infections. *Surgery.* **103**: 107-110.

CAMMAROTA, G., TURSI, A., MONTALTO, M., PAPA, A., VENETO, G. & BERNARDI, S. 1996. Role of dental plaque in the transmission of *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Gastroenterol.* **22**: 174-177.

COLOMBO, A. P., HAFFAJEE, A. D., DEWHIRST, F. E., PASTER, B. J., SMITH, C. M., CUGINI, M. A. & SOCRANSKY, S.S. 1998. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J. Clin. Periodontol.* **25**: 169-180.

COLOMBO, A. P., TELES, R., TORRES, M. C., SOUTO, R. M., MENDES, M. C. S., ROSALEM JR, W. & UZEDA, M. 2002. Subgingival microbiota of Brazilian Subjects with untreated chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **73**: 360 – 369.

CONTRERAS, A., NOWZARI, H. & SLOTS, J. 2000. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**: 15-20.

CONTRERAS, A. & SLOTS, J. 2001. Typing of herpes simplex virus from human periodontium. *Oral Microbiol. Immunol.* **16**: 63-69.

COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D. E., KORBER, D. R. & LAPPIN-SCOTT, H. M. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-715.

DAHLEN, G. & WIKSTROM, M. 1995. Occurrence of enteric rods, staphylococci and candida in subgingival plaques. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**: 42-47.

DAHLEN, G., LINDE, A., MOLLER, A. J. R. & OHMAN A. 1982. A retrospective study of microbiologic samples from oral mucosal lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **53**: 250-255.

DALY, C. 1999. Bacteremia due to periodontal probing in periodontitis and gingivitis patients. *J. Dent. Dent. Res.* **78**: 268-272.

DE VOS, D., LIM, A. JR., PIRNAY, J.P., STRUELENS, M., VANDENVELD, C., DUINSLAEGER, L., VANDERKELEN, A. & CORNELIS, P. 1997. Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, oprI and oprL. *J. Clin Microbiol.* **36**: 1295-1299.

DEBELIAN, G. J., OLSEN, I. & TRONSTAT, L. 1995. Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endod. Dent. Traumatol.* **11**: 142-147.

DESHPANDE, R. G., KHAN, M. & GENCO, C. A. 1998. Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **66**: 5337-5343.

DIXON, M. F. 1991. Helicobacter pylori and peptic ulceration and Histopathological aspects. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **6**: 125-130.

DORN, B. R., DUNN, W.A. Jr. & PROGULSKE-FOX, A. 1999. Invasion of human coronary artery cells by periodontal pathogens. *Infect. Immun.* **67**: 5792-5798.

DOWSET, S. A., ARCHILA, L., SEGRETO, V. A., GONZALEZ, C. R., SILVA, A., VASTOLA, K. A., BARTIZEK, R.D. & KOWOLIK, M. J. 1999. *Helicobacter pylori* infection in indigenous families of Central America: Serostatus and oral and fingernail carriage. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2456-2460.

DRANGSHOLT, M. T. 1998. A new casual model of dental diseases associated with endocarditis. *Ann. Periodontol.* **3**: 184-187.

DRINNAN, A. J. & GOGAN, C. 1990. Bacteremia and dental treatment. J. Am. Dent. Assoc. **120**: 378-382.

DURACK, D. T., BEESON, P. B. & PETERSDORF, R. G. 1973. Experimental bacterial endocarditis. Production and Progress of the disease in rabbits. Br. J. Exp. Pathol. **54**: 142-147.

DYE, B. A., KRUSZON-MORAN, D. & MC QUILLAN, D. 2002. The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. Am. J. Public Health. **92**: 1809-1815.

ELSNER, H. A., SOBOTTKA, I., MARCK, M., CLAUSSEN, M., LAUFS, R. & WIRTH, R. 2000. Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **19**: 39-42.

FABRICIUS, L., DAHLEN, G., HOLM, S. E. & MOLLER, A. J. R. 1982. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. Scand. J. Dent. Res. **90**: 200-206.

FERGUSON, D. A., CHUANFU, L. I., PATEL, N. R., MAYBERRY, W. R., CHI, D. S. & THOMAS, E. 1993. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. J. Clin. Microbiol. **31**: 2802-2804.

FIDDIAN-GRENN, R. G. & BACKER, S. 1991. Nosocomial pneumonia in the critically ill: product of aspiration or translocation? Crit.Care Med. **19**: 763-767.

GEBARA, E. C. E., PANNUTI, C., FARIA, C. M., CHEHTER, L., MAYER, M. P. A. & LIMA, L. A. P. A. 2004. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**: 277-280.

GEBARA, E. C. E., FARIA, C. M., PANNUTI, C., CHETHER, L., MAYER, M. P. A. & LIMA, L. A. P. A. 2006. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *J. Clin. Periodontol.* **33**: 329-333.

GENTA, R. M., HAMMER, H. W. & GRAHAM, D. Y. 1993. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: Frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum. Pathol.* **24**: 577-583.

GIBBONS, R. J., SOCRANSKY, S. S., SAWYER, S., KAPSIMALIS, B. & MACDONALD, J. B. 1963. The microbiology of the gingival crevice area of man. II The predominant cultivable organisms. *Arch. Oral. Biol.* **8**: 281-286.

GIBBONS, R. J., SOCRANSKY, S. S., DE ARAÚJO, W. C. & VAN HOUTE, J. 1964. Studies on the predominant cultivable microbiota of dental plaque. *Arch. Oral. Biol.* **19**: 365-370.

HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSKY, S. S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol.* 2000. **5**: 78-111.

HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., DIBART, S., SMITH, C., KENT JR. R. L. & SOCRANSKY, S. S. 1997. The effect of SRP on the clinical and microbiological parameters of periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* **24**: 324-334.

HAMMOND, B. F. 1992. Major bacterial diseases, p.165-190. In J. Slots & M. A. Taubman (ed.), *Contemporary oral microbiology and immunology*. Mosby, St. Louis, Mo.

HARASZTHY, V. I., ZAMBON, J. J., TREVISAN, M., ZEID, M. & GENCO, R. J. 2000. Identification of periodontal pathogens in atheromatous plaques. *J. Periodontol.* **71**: 1554-1560.

HEIMDAHL, A., HALL, G., HEDBERG, M., SANDBERG, H., SODER, P. O., TUNER, K. & NORD, C. E. 1990. Detection and quantitation by lysis-filtration of bacteremia after different oral surgical procedures. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2205-2209.

HELOVUO, H., HAKKARAINEN, K. & PAUNIO, K. 1993. Changes in the prevalence of subgingival enteric rods, staphylococci and yeasts after treatment with penicillin and erythromycin. *Oral Microb. Immunol.* **8**: 75-79.

HERZBERG, M. C. & MEYER, M. W. 1996. Effects of oral flora on platelets: possible consequences in cardiovascular disease. *J. Periodontol.* **67**: 1138-1143.

HERZBERG, M. C. & MEYER, M. W. 1998. Dental plaque, platelets, and cardiovascular diseases. *Ann. Periodontol.* **3**: 151-155.

HOLT, S. C. & BRAMANTI, T. E. 1991. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* **2**: 177-281.

ISHIHARA, K., MIURA, T., KIMIKUZA, R. 1997. Oral bacteria inhibit *Helicobacter pylori* growth. *FEBS Microbiol. Lett.* **152**: 355-361.

JACKSON, M. S., BAGG, J., GUPTA, N. M. & STURROCK, R. D. 1999. Oral carriage of staphylococci in patients with arthritis. *Rheumatol.* **38**: 572-577.

JETT, B. D., HUYCKE, M. M. & GILMORE, M. S. 1994. Virulence of *Enterococci*. *Clin. Microbiol. Reviews.* **7**: 462-478.

JOSHI, N., O'BRIAN, T. & APPELBAUN, P. C. 1991. Pleuropulmonary infections caused by *Eikenella corrodens*. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 1207-1211.

KAMMA, J. J., NAKOU, M. & BAEHNI, P. C. 1999. Clinical and microbiological characteristics of smokers with early onset periodontitis. *J. Periodont.* **34**: 25-30.

KAMMA, J. J., CONTRERAS, A. & SLOTS, J. 2001. Herpes viruses and periodontopathic bacteria in early-onset periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **28**: 879-884.

KELLY, S. M., PITCHER, M. C. L., FARMERY, S. M. & GIBSON, G. R. 1994. Isolation of *Helicobacter pylori* from feces of patients with dyspepsia in the United Kingdom. *Gastroenterol.* **107**: 1671-1675.

KILLIAN, M. 1982. Systemic disease: manifestations of oral bacteria. p.832-838. In J. R. McGhee, S. M. Michalek & G. H. Cassel (ed.), Dental microbiology. Harpers & Row, Philadelphia, Pa.

KIM, K. J., YOU, Y. O. & KIM, E. S. 1995. Hemolysin like gene of *Staphylococcus lugdenensis* in acute oral infection have partial homology with hemolysin gene of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 61- 67.

KOLENBRANDER, P. E. & LONDON, J. 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.* **175**: 3247-3252.

KUMAR, P.S, GRIFFEN, A. L., BARTON, J. A., PASTER, B. J., MOESCHBERGER, M. L. & LEYS, E. J. 2003. New bacterial species associated with chronic periodontitis. *J. Dent. Res.* **82**: 338-344.

KUVIN, J. T. & KIMMELSTIEL, C. D. 1999. Infectious causes of arterosclerosis. *Am. Heart J.* **137**: 216-220.

LACASSIN, F., HOEN, B., LEPOR, C., SELTON-SUTY, C., DELAHAYE, F., GOULET, V., ETIENNE, J. & BRIANCON, S. 1995. Procedures associated with associated endocarditis in adults: a case-control study. *Eur. Heart J.* **16**: 1968-1973.

LAINE, M. J., FARRE, M. A., CRUSIUS, B. A. & PENA, S. 2000. The mouthwash: an non-invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J. Periodontol.* **71**: 1315-1318.

LESSIN, M.P., JORDENS, J.Z. & BOWLER, I. C. 1996. When should healthcare workers be screened for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*? *J. Hosp. Infect.* **34**: 205-210.

LEVISON, M. E. 1994. Pneumonia, including necrotizing pulmonary infections (lung abscess). p.1184-1191. In K. J. Isselbacher, E. Braunwald, & J. D Wilson (ed.), *Harrison's principles of internal medicine*. McGraw-Hill, New York, N.Y.

LI, X., K., KOLLTVEIT, M., TRONSTAD, L. & OLDEN, I. 2000. Systemic diseases caused by oral infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 547-570.

LINDHE, J. 1999. *Tratado de Periodontologia Clínica e Implantologia Oral*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.1-41.

LLEO, M. M., BONATO, B., TAFI, M. C., SIGNORETTO, C., PRUZZO, C. & CANEPARI, P. 2005. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2005. **40**:289-294.

LOE, H., ANERUD A., BOYSEN, H. & MORRISON, E. 1986. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lanka laubourers 14 to 46 years of age. *J. Clin. Periodontol.* **13**: 431-436.

LOESCHE, W. J., LOPATIN, D. E., STOLL, J., VAN POPERIN, N. & HUJOEL, P. P. 1992. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: Can culture be considered the primary reference standard? *J. Clin. Microbiol.* **30**: 418 – 426.

LOFTHUS, J.E., WAKI, M. Y., JOLKOVSKY, D. L., OTOMO-CORGEL, J., NEWMAN, M. G., FLEMMING, T. & NACHNANI, S. 1991. Bacteremia following subgingival irrigation and scaling and root planing. *J. Periodontol.* **62**: 602-608.

LORENZ, K. A & WEISS, P. J. 1994. Capnocytophagal pneumonia in a healthy man. *West J. Med.* **160**: 79-80.

MADINIER, I. M., FOSSE, T. M. & MONTEIL, R. A. 1997. Oral carriage of *Helicobacter pylori*: a review. *J. Periodontol.* **68**: 2-10

MAGER, D. L., XIMENEZ-FYVIE, L. A., HAFFAJEE, A. D. & SOCRANSCKY, S. S. 2003. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J. Clin. Periodontol.* **30**: 644-654.

MAPSTONE, N. P., LYNCH, D. A. F., LEWIS, F. A., AXON, A. T. R., TOMPKINS, D. S. & DIXON, M. F. 1993. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J. Clin. Pathol.* **46**: 540-543.

MARTIN M. V. & HARDY, P. 1991. Two cases of oral infection by methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *Br. Dent. J.* **170**: 63-68.

MARTINEZ-GOMES, J., DIOUF, A., LAKASSI, N. & SIXOU, M. 2006. Absence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity of 10 non-dyspeptic subjects demonstrated by real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.* **21**: 407-410.

MASON, W.J., BLEVINS, J. S., BEENKEN, K., WIBOWO, N., OJHA, N. & SMELTZER, M. S. 2001. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. *J. Clin. Microbiol.* **39**: 3332-3338.

MC GHEE, J. R. 1982. Microbial pathogenic mechanisms. p. 374-387. In J. R. McGhee, S. M. Michalek & G. H. Cassel (ed.), *Dental microbiology*. Harper & Row, Philadelphia, Pa.

MERGRAN, D. W. & CHOW, A. W. 1986. Bacterial aspiration and anaerobic pleuropulmonary infections. p. 269-292. In M. A. Sande, L. D. Hudson, & R. K. Root (ed.), *Respiratory infections*. Churchill Livingstone, New York, N.Y.

MIYABAIASHI, H., FURIHATA, K., SHIMIZU, T., UENO, I. & AKAMATSU, T. 2000. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter*. **5**: 30-37.

MIYAKE, Y., IWAI, M., SUGAI, M., MIURA, K., SUGINAKA, K. & NAGASAKA, M. 1991. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* from the tongues of children. *J. Dent. Res.* **70**: 1045-1050.

MOORE, W. E. C. & MOORE, L. H. 1994. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol.* **2000**. **5**: 66-77.

MOORE, W. E. C., HOLDEMAN, L. U. & CATO, E. P. 1985. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. *Infect. Immunol.* **48**: 507-511.

MORRIS, J. G. Oxygen and growth of the oral bacteria. p. 293-306. 1979. In Kleinberg, I., Ellison, S. A., & Mandel, I. D. (ed.). Proceedings of saliva and dental caries. Sp. Supp. Microbiol. Abstr.

MORRIS, J. F. & SEWELL, D. L. 1994. Necrotizing pneumonia caused by mixed infection with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Actinomyces israelii*: case report and review. Clin. Infect. Dis. **18**: 450-455.

MURRAY, B. E., CHURCH, D. A. & WANGER, A. 1986. Comparison of two β -lactamase-producing strains of *Streptococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. **30**: 861-864.

NAGY, E. & FOLDES, J. 1991. Inactivation of metronidazole by *Enterococcus faecalis*. J. Antimicrob. Chemother. **27**: 63-70.

NAGY, E., WERNER, H. & HEIZMANN, W. 1990. *In vitro* activity of daptomycin-metronidazole combinations against mixed bacterial cultures: reduced activity of metronidazole against *Bacteroides* species in the presence of *Enterococcus faecalis*. Eur. J. Clin. Microbiol. **9**: 287-292.

NAVAZESH, M. & MULLIGAN, R. 1995. Systemic dissemination as a result of oral infection in individuals 50 years of age and older. Spec. Care Dentist. **15**: 11-16.

NGUYEN, A. M., ENGSTRAND, L., GENTA, R. M., GRAHAM, D. Y. & EL-ZAATARI, F. A. K. 1993. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **31**: 783-787.

NGUYEN, A. M., EL-ZAATARI, F. A. K. & GRAHAM, D. Y. 1995. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **79**: 705-709.

NORD, C. E. & WADSTROM, T. 1973. Characterization of haemolytic enterococci isolated from oral infections. *Acta Odontol Scand.* **31**: 387-393.

NOVAK, R. M., HOLZER, T. J. & LIBERIN, C. R. 1988. Human neutrophil phagocytic killing of hemolysin-producing and non-hemolysin-producing *Enterococcus faecalis*. *Clin. Res.* **36**: 883-886.

OKUDA, K. & EBIHARA, Y. 1998. Relationships between chronic oral infectious diseases and systemics diseases. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* **39**: 165-170.

OKUDA, K., KIMIZUKA, R., KATAKURA, A., NAKAGAWA, T. & ISHIHARA, K. 2000. Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori*-infected disease. *J. Periodontol.* **74**: 123-128.

OKUDA, K., KIMIKUZA, R., KATAKURA, A., NAKAGAWA, T. & ISHIHARA, K. 2003. Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori*-infected disease. *J. Periodontol.* **74**: 123-128.

OLIVIER, B. J., BOND, R. P., VAN ZYL, W. B., DELPORT, M., SLAVIK, T., ZYADI, C. & VAN DER MERWE, S. W. 2006. Absence of *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 635-636.

OSHOWO, A., GILLAM, D., BOTHA, A., TURNIO, M., HOLTON, J. & BOULOS, P. 1998. *Helicobacter pylori*: The mouth, stomach and gut axis. *Ann. Periodontol.* **3**: 276-280.

OVERHOLSER, C. D., MOREILLON, P. & GLAUSER, M. P. 1987. Experimental bacterial endocarditis after dental extractions in rats with periodontitis. *J. Infect. Dis.* **155**: 107-111.

OWEN, M. K. 1994. Prevalence of oral methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an institutionalized veterans populations. *Spec. Care Dentist.* **14**: 75-79.

PAGE, R. C. 1988. The pathobiology of periodontal diseases may affect systemic diseases: inversion of a paradigm. *Ann. Periodontol.* **3**: 108-112.

PAGE, R. C., OFFENBACHER, S., SCHROEDER, H. E., SEYMOUR, C. J. & KORNMAN, K. S. 2000. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *J. Periodontol.* **14**: 216-248.

PAPAPANOU, P. N. 1996. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann. Periodontol.* **1**: 1-36.

PAPAPANOU, P. N., MADIANOS, P. N., DAHLEN, G., J. & SANDROS, J. 1997. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *Eur. J. Oral Sci.* **105**: 389-394.

PASTER, B. J. & GIBBONS, R. J. 1986. Chemotactic response to formate by *Campylobacter concisus* and its potential role in gingival colonization. *Infect. Immun.* **25**: 378-383.

PASTER, B.J., BARTOSZYK I. M. & DEWHIRST, F. E. 1998. Identification of oral streptococci using PCR-based, reverse-capture, checkerboard hybridization. *Methods in Cell Sci.* **20**: 223-227.

PASTER, B.J., BOCHES, S. K. & GALVIN, J. L. 2001. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* **183**: 3770-3783.

PASTER, B.J., OLSEN, J.A. & DEWHIRST, F. E. 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol.* 2000. **42**: 1-8.

PAULE, S. M., TRICK, W. E. & TENOVER, S. C. 2003. Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4805-4807.

PERCIVAL, R. S., CHALLACOMBE, S. J. & MARSH, P. D. 1991. Age-related microbiological changes in the salivary and plaque microflora of healthy adults. *J. Med. Microbiol.* **35**: 5-9.

PETTI, C. A., POLAGE, C. R. & SCHREKENBERGER, P. 2005. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 6123-6125.

PIOCHI, B. J. A. & ZELANT, F. 1995. Contribution on the study of *staphylococcus* isolated from the mouth. III *Staphylococcus* isolated from dental plaque. Rev. Fac. Odont. São Paulo. **5**: 91-94.

POLLACK, M. & ANDERSON, S. E. 1978. Toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A for human macrophages. Infect. Immun. **19**: 1092-1096.

RAMS, T. E., BABALOLA, O. O. & SLOTS, J. 1990. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. Oral Microbiol. Immunol. **5**: 166-170.

RAMS, T. E., FEIK, D., YOUNG, V., HAMMOND, B. F. & SLOTS, J. 1992. *Enterococci* in human periodontitis. Oral Microbiol. Immunol. **7**: 249-253.

REDDY, M. S. 2007. Reaching a better understanding of non-oral disease and the implication of periodontal infections. Periodontol. 2000. **44**: 9-14.

RIDKER, P. M., CUSHMAN, M., STAMPFER, M. J., TRACY, R. P. & HENNEKENS, C. H. 1997. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N. Engl. J. Med. **336**: 973-974.

RIGGIO, M. P. & LENNON, A. 1999. Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. J. Med. Microbiol. **48**: 317-322.

RIGGIO, M.P., MACFARLANE, T.W., MACKENZIE, D., LENNON, A., SMITH, A. J. & KINANE, D. 1996. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for

detection *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. J. Periodontal Res. **31**: 496-501.

ROBERTS, G. J. 1997. Dental bacteremia in children. Pediatr. Cardiol., 1997. **18**: 24-28.

ROBERTS, A. P. & MULLANY, P. 2006. Genetic basis of horizontal gene transfer among oral bacteria. Periodontol. 2000. **42**: 36-46

RÖÇAS, I. N., SIQUEIRA, J.F. JR. & SANTOS, K. R. N. 2004. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J. Endod. **30**: 315-320.

ROSEBURY, T. 1966. Microbiology. J. Am. Dent. Assoc. **72**: 1439-1447.

ROSSI T., PELTONEN, L., LAINE, J., EEROLA, E., VUOPIO-VARKILA, J. & KOTILAINEN, P. 1997. Erradication of the long-term carriage of methicilli-resistant *Staphylococcus aureus* in patients wearing dentures: a follow-up of 10 patients. J. Hosp. Infect. **34**: 311-315.

ROUSSEAU, P. 1991. Acute suppurative parotitis. J. Am. Geriat. Soc. **38**: 897-902.

SANCHEZ-CORDERO, S., HOFFMAN, H. & STALL, S. S. 1979. Occurrence of staphylococcus in periodontal pockets of diabetic and nondiabetic adults. J. Clin. Microbiol. **50**: 109-113.

SCANNAPIECO, F. A. 1998. Position paper: periodontal disease as a potencial risk factor for systemic diseases. J. Periodontol. **69**: 841-850.

SCANNAPIECO, F. A. & MYLLOTE, J. M. 1996. Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. *J. Periodontol.* **67**: 1114-1119.

SEDGLEY, C. M., LENNAN, S. L. & CLEWELL, D. B. 2004. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**: 95-101

SEYMOUR, R.A., PRESHAW, P. M., THOMASON, J.M., ELLIS, J. S. & STEELE, J. G. 2003. Cardiovascular diseases and Periodontology. *J. Clin. Periodontol.* **30**: 279–292.

SHAMES, B., KRAJDEN, S., FUKSA, M., BABIDA, C. & PENNER, J. L. 1989. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J. Clin. Microbiol.* **27**: 2849-2852.

SHINZATO, T. & SAITO, A. 1994. A mechanism of pathogenicity of “*Streptococcus milleri* group” in pulmonary infection: synergy with anaerobe. *J. Med. Microbiol.* **40**: 118-124.

SIQUEIRA, J. F. JR., ROCAS, I. N., SOUTO, R., DE UZEDA, M. & COLOMBO, A. P. 2002. *Actinomyces* species, *streptococci*, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *J. Endod.* **28**: 168-172.

SLOTS, J. & RAMS, T. E. 1992. Microbiology of periodontal disease. p. 425-443. In J. Slots, & M. A. Taubman (ed.), *Contemporary oral microbiology and immunology*. Mosby, St. Louis, Mo.

SLOTS, J., RAMS, T. E. & LITSGARTEN, M. A. 1988. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microb. Immunol.* **3**: 47-52.

SLOTS, J., FEIK, D. & RAMS, T. E. 1990. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Acinetobacter* in human periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* **5**: 149-154.

SLOTS, J., RAMS, T.E., FEIK, D., TAVERAS, H. D. & GILLESPIE, G. M. 1991. Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic. *Oral Microbiol. Immunol.* **62**: 543-547.

SMITH, G. L. F., SOCRANSKY, S. S. & SMITH C. M. 1989. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol. Immunol.* **4**: 47-51.

SMITH, A. J., JACKSON, M. S. & BAGG, J. 2001. The ecology of *Staphylococcus* species in the oral cavity. *J. Med. Microbiol.* **50**: 940-944.

SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. 1991. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J. Periodontol. Res.* **26**: 195-212.

SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. 1992. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. *J. Periodontol.* **63**: 322-31.

SOCRANSKY, S. S. & HAFFAJEE, A. D. 2005. Periodontal microbial ecology. *Periodontol.* 2000. **38**: 153-187.

SOCRANSKY, S. S., SMITH, C., MARTIN, L., PASTER, B. J., DEWHIRST, F. E. & LEVIN, A. E. 1994. "Checkerboard " DNA-DNA hybridization. *Biotech.* **17**: 788-792.

SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., CUGINI, M. A., SMITH, C. & KENT JR, R. L. 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* **25**: 134-144.

SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., SMITH, C., MARTIN, L., HAFFAJEE, J. A., UZEL, N. G. & GOODSON, J. M. 2004. The use of checkerboard DNA-DNA hybridization to study complex microbial ecosystems. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**: 352-362.

SONG, Q., LANGE, T., SPAHR, A., ADLER, G. & BODE, G. 2000. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J. Med. Microbiol.* **49**: 349-353.

SOUTO, R., ANDRADE, A. F. B., UZEDA, M. & COLOMBO, A. P. V. 2006. Prevalence of "non-oral" pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz. J. Microbiol.* **37**: 208 – 215.

SUNDQVIST, G., FIGDOR, D., PERSSON, S. & SJÖGREN, U. 1998. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral surg. Oral Med. Oral Pathol. Ora Radiol. Endod.* **85**: 86-93.

TANG, Y. W., ELLIS, N. M., HOPKINS, M. K., SMITH, D. H., DODGE, D. E. & PERSING, D. H. 1998. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J. Clin. Microbiol.* **36**: 3674-3679.

TAWARA Y., HONMA, K. & NAITO, Y. 1996. Methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* on denture surfaces. *Bull. Tokyo Dent. Coll.* **37**: 119-123.

THEILADE, E. & BUDTZ-JORGENSEN, E. 1988. Predominant microflora of plaque on removable dentures in patients with denture induced stomatitis. *Oral Microbiol. Immunol.* **3**: 8-13.

THEILADE, E., BUDTZ-JORGENSEN, E & THEILADE, J. 1983. Predominant cultivable microflora of plaque on removable dentures in patients with healthy oral mucosa. *Arch. Oral Biol.* **28**: 675-680.

THODEN VAN VELZEN, S. K., ABRAHAM-INPIJIN, J. & MOORER, J. R. 1984. Plaque and systemic disease: a reappraisal of the focal infection concept. *J. Clin. Periodontol.* **11**: 209-213.

UMEDA, M., KOBAYASHI, H., TAKEUCHI Y., HAYASHI, J., MOTOTONE-HAYASHI, Y. & YANO, K. 2003. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J. Periodontol.* **74**: 129-134.

VAN DER VELDEN, U. 2005. Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontol.* 2000. **39**: 13-21.

VAN DYKE, T. E., DOWELL, V. R., JR., OFFENBACHER, S., SYNDER, W. & HERSH, T. 1986. Potencial role of microorganisms isolated from periodontal lesions in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Infect. Immun.* **53**: 671-674.

WAHLIN, Y. B. & HOLK, A. K. 1988. Changes in the oral microflora in patients with acute leukemia and related disorders during the period of induction therapy. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **65**: 411-417.

WILLIS, S. G., SMITH, K. S., DUNN, V. L., GAPTER, L. A., RIVIERE, K. H. & RIVIERE, G. R. 1999. Identification of seven *Treponema species* in health-and disease-associated dental plaque by nested PCR. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 867-869.

YUAN, A., LUH, K. T. & YANG, P. C. 1994. *Actinobacillus actinimycetemcomitans* pneumonia with possible septic embolization. *Chest.* **105**: 64-68.

ZOLETTI, G. O., SIQUEIRA, J. F., JR. & SANTOS, K. R. N. 2006. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and -independent approaches. *J. Endod.* **32**: 722-726.

Anexos

Anexo 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - INSTITUTO DE
MICROBIOLOGIA /FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado Senhor e Senhora,

A pesquisa da qual você está sendo convidado a participar visa identificar e caracterizar as doenças que afetam as **gengivas e o osso** que suportam os dentes na boca, denominadas **DOENÇAS PERIODONTAIS**. As doenças periodontais são infecções causadas pelo **acúmulo de bactérias** específicas presentes na **placa dental bacteriana**, localizada abaixo da gengiva, o que leva a uma inflamação e possível perda do dente. Esta doença afeta principalmente adultos, mas também pode ocorrer em indivíduos jovens e crianças. Ela se manifesta pela inflamação da gengiva, com sangramento e vermelhidão gengival, presença de tártaro e placa dental (massa branca aderida ao dente), dor, presença ou não de pus e mobilidade (“amolecimento”) do dente. Além das bactérias, outros fatores podem favorecer o aparecimento desta doença, como o fumo, stress, diabetes e a composição genética do paciente. Alguns indivíduos possuem **genes específicos** no seu cromossomo que podem aumentar sua chance de desenvolver a doença. Por isso, este estudo irá avaliar as bactérias encontradas na placa dental e alguns genes específicos que possam ter alguma influência nessas doenças. Para participar deste estudo é necessário ter doença periodontal (**sangramento, vermelhidão e inchaço da gengiva, dente amolecido, dor, presença de tártaro**), não estar grávida nem amamentando, estar com boa saúde geral, não ter tido tratamento para as gengivas ou ter tomado antibióticos nos últimos 6 meses. O protocolo da pesquisa envolve inicialmente um **exame clínico oral** (exame da gengiva e dentes para avaliar inflamação e presença de placa dental ou tártaro) e **radiográfico** de todos os dentes. Além disso, a **placa dental bacteriana** será removida com uma cureta periodontal estéril (usada para remoção de tártaro) dos dentes mais doentes. A **saliva** (que contém grandes quantidades de células da bochecha) também será coletada num recipiente plástico para a identificação dos genes específicos do paciente. Os indivíduos selecionados que aceitarem participar desse estudo receberão **tratamento periodontal gratuito**, consistindo de limpeza dos dentes para remoção da placa dental e tártaro, e controle da higiene oral. O estudo terá uma duração de 6-8 meses e envolverá de 6-12 visitas de aproximadamente 1 hora, sendo que haverá uma reavaliação aos 3 e 6 meses após o tratamento. Todos os exames e tratamento serão feitos com material estéril e equipamento odontológico adequados na Clínica Integrada da Faculdade de Odontologia da UFRJ, por alunos treinados sob supervisão dos professores responsáveis. Pacientes que necessitarem de outros tratamentos serão encaminhados às diferentes especialidades da Clínica Integrada de Graduação. Os procedimentos deste estudo envolvem exames clínicos e tratamento de gengiva que são normalmente feitos no consultório dentário e não implicam em nenhum risco maior ao paciente. Os participantes terão como benefício o tratamento odontológico por profissionais especializados, sem custos, assim como um melhor conhecimento do seu estado de saúde oral e geral. Os resultados de seus exames serão confidenciais e você poderá requisitá-los quando quiser. Finalmente, você estará à vontade para desistir de participar desse estudo, a qualquer momento, sem prejuízo ao seu tratamento. Portanto, uma vez tendo lido e entendido tais esclarecimentos, solicitamos que você date e assine esse formulário de consentimento.

Declaro ter lido e entendido os termos da presente pesquisa e, portanto, consinto em participar, abaixo assinado,

Rio de Janeiro ____/____/____, _____

Assinatura do paciente

Nome _____ tel: _____

ANA PAULA VIEIRA COLOMBO (TELEFONES DE CONTATO: 21 2537-6815/ 21 91539474)

Anexo 2

Anexo 3
FACULDADE de Odontologia - FICHA DE ANAMNESE

Nome: _____ Data de Nascimento: ____/____/____

Endereço: _____

Telefone: _____ Estado _____

civil: _____ Profissão: _____

Questionário Médico

1. Nome do seu médico: _____ Telefone: _____

2. Data do último exame médico: _____

3. Você já foi hospitalizado(a)? Sim Não NS

4. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

5. Você está sob cuidados médicos? Sim Não NS

6. Em caso de resposta positiva, qual o motivo? _____

7. Você tem ou já teve alguma das seguintes condições:

a) Doenças congênitas do coração? Sim Não NS

b) Doenças cardíacas (ex.: enfarte, angina, derrame, pressão alta, pressão baixa)? Sim Não NS

• Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? Sim Não NS

• Inchaço nos pés ou nos tornozelos? Sim Não NS

• Dor, pressão ou mal estar no peito? Sim Não NS

c) Febre reumática? Sim Não NS

d) Endocardite bacteriana? Sim Não NS

e) Sopro no coração? Sim Não NS

f) Desmaios convulsões ou epilepsia? Sim Não NS

g) Dor de cabeça freqüente (2 ou mais por semana)? Sim Não NS

h) Tratamento nervoso? Sim Não NS

i) Problemas pulmonares (ex.: tuberculose, asma, enfisema, bronquite)? Sim Não NS

j) Hepatite, doenças hepáticas, icterícia? Sim Não NS

k) Artrite ou dores articulares? Sim Não NS

l) Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorréia, AIDS)? Sim Não NS

m) Diabetes? Sim Não NS

• Demora na cicatrização dos ferimentos? Sim Não NS

• Você urina mais de seis vezes por dia? Sim Não NS

• Você sente sede a maior parte do tempo? Sim Não NS

n) Problemas sangüíneos (ex.: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematemese, hemotúria, epistaxes) Sim Não NS

o) Úlceras ou outros problemas estomacais? Sim Não NS

p) Reação alérgica a: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranqüilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)? Sim Não NS

8. Você já sofreu transfusão sangüínea? Sim Não NS

9. Você está tomando algum medicamento (listar nas observações)? Sim Não NS

10. Você teve um aumento ou diminuição acentuada do peso? Sim Não NS

11. Você teve uma variação recente no apetite? Sim Não NS

12. Você sofreu tratamento com raios x, rádio ou cobalto? Sim Não NS

Somente para mulheres

13. Você está grávida? Sim Não NS

14. Em caso de resposta positiva, há quantos meses? _____
15. Você já passou pela menopausa? Sim Não NS
16. Você está tomando algum hormônio? Sim Não NS

Questionário Odontológico

1. Nome do seu dentista: _____ Telefone: _____
2. Frequência de visitas ao dentista: _____
3. Data da última visita ao dentista: _____
4. História das extrações:
- a) Causa provável das extrações: _____
- b) Data da última extração: _____
- c) Você teve reações adversas durante ou após alguma extração dentária Sim Não NS
- d) Você teve sangramento excessivo após alguma extração dentária? Sim Não NS
5. Suas gengivas sangram? Sim Não NS
6. Você já teve algum abscesso periodontal ou GUNA? Sim Não NS
7. Você já fez algum tratamento periodontal? Sim Não NS
8. Em caso de resposta positiva, qual? _____
9. Você já teve algum tratamento ortodôntico? Sim Não NS
10. Em caso de resposta positiva, listar data do tratamento, condição tratada, e tempo de duração do tratamento: _____
11. Você já fez algum tratamento de canal? Sim Não NS
12. Em caso de resposta positiva, data do tratamento de canal: _____
13. Você usa ou já usou alguma prótese dentária? Sim Não NS
14. Em caso de resposta positiva, citar idade da prótese em uso: _____
15. História dentária familiar:
- a) Alguém em sua família tem ou teve doença periodontal? Sim Não NS
- b) Alguém em sua família teve perda precoce dos dentes? Sim Não NS
- c) Em caso de resposta positiva, listar quem e possíveis causas: _____
16. Você costuma respirar pela boca? Sim Não NS
17. Você range os dentes? Sim Não NS
18. Quantas vezes você escova os dentes por dia? _____
19. Alguém já lhe ensinou a escovar os dentes? Sim Não NS
20. Você usa fio dental? Sim Não NS
21. Você está usando ou já usou algum medicamento para tratar de problemas dentários? Sim Não NS
22. Em caso de resposta positiva, que medicamento, quando usou e condição que levou ao uso: _____
23. Você fuma? Sim Não
24. Em caso de resposta positiva, quantos cigarros por dia? _____
25. Caso você seja ex-fumante, a quanto tempo parou, por quanto tempo fumou, e quantos cigarros costumava fumar? _____

Assinatura

_____/_____/_____
Data

Anexo 4

Publicações Científicas

ARTIGO 1

Detection of *Helicobacter pylori* in subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontitis patients by polymerase chain reaction.

Renata Souto MSD*¹, Ana Paula Vieira Colombo DMSc¹

¹Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ); Rio de Janeiro;
Brazil

Summary

Helicobacter pylori has been associated with the development of peptic ulcers and gastric cancer. Although the oral cavity may be a source of transmission, it is unknown whether the oral *habitats* act as permanent reservoirs for this bacterium, particularly in the presence of periodontal infection. The purpose of this study was to evaluate the prevalence of *H. pylori* by polymerase chain reaction (PCR) in subgingival biofilm and saliva of patients with periodontal disease. Samples were obtained from 56 periodontally healthy and 169 periodontitis subjects. DNA was extracted from the samples and detection of *H. pylori* was carried out by PCR using the JW22/23 primers. In general, *H. pylori* was detected in 24% of all samples evaluated. A significant higher prevalence of *H. pylori* was observed in subgingival biofilm (33.3%) compared to saliva samples (20%) ($p < 0.05$). *H. pylori* was detected significantly more often in saliva and subgingival samples of periodontitis patients (23.5% and 50%, respectively) compared to periodontally healthy subjects (7.3% and 11.4%, respectively; $p < 0.05$). The present data showed that *H. pylori* is frequently detected in the oral microbiota of periodontitis patients suggesting that periodontal infection may favor the colonization by this species. Close attention should be given to these patients regarding the risk for development and recurrence of gastric *H. pylori* infection.

Key Words: *Helicobacter pylori*; PCR, subgingival biofilm, saliva, periodontitis.

Introduction

Helicobacter pylori is a curved, spiral, or gull-wing shaped microaerophilic, Gram-negative, motile bacterium with polar-sheathed flagellae. This species is considered to be a pathogen responsible for gastritis and peptic ulcers, and a risk factor of gastric cancer (7, 12, 14, 35, 39). Approximately 10% of individuals are affected by gastritis and/or gastric ulcer during their lifetime and over 50% of the world's population carries this infection. The mode of transmission of *H. pylori* is poorly understood, although the oral-oral, gastric-oral and faecal-oral routes are possible (22). The natural reservoir for *H.*

pylori is unknown, but researchers have suggested that the primary extragastric reservoir for *H. pylori* is the oral cavity (4, 6, 9, 10, 18, 21, 26, 29, 32). Nevertheless, great variability in *H. pylori* frequency in the oral microbiota has been shown and some authors failed to find evidence supporting the role of the oral cavity as a significant reservoir of *H. pylori* (3, 19, 21, 22, 24, 25, 33). The presence of *H. pylori* in the oral cavity raises the question of whether the mouth could be a common source for re-infection of the stomach after treatment (20, 30). Moreover, it seems conceivable that oral health status directly or indirectly influences the colonization and the process of *H. pylori* infection or recurrence (8). In particular, individuals with periodontal diseases may harbor high proportions and levels of several bacterial pathogens of medical importance (34). Very few studies have evaluated the correlation between the prevalence of *H. pylori* and periodontal diseases (8, 10, 11, 29, 36). Thus, the aim of this study was to determine the carriage rate of *H. pylori* in subgingival biofilm and saliva from patients with different periodontal conditions and no gastric symptoms by polymerase chain reaction (PCR).

Material and methods

Subject Population and Clinical Examination

Two hundred and twenty five adult subjects who sought dental treatment at the Dental School of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, were recruited for the study. Informed consent was obtained from all enrolled individuals. The study protocol was approved by the Review Committee for Human Subjects for Human Subjects of the Clementino Fraga filho University Hospital. Exclusion criteria included gastric symptoms, pregnancy, use of local or systemic antimicrobial agents within 6 months prior to the entry into the study, smoking, diabetes, and other systemic conditions that could affect the periodontal status. All subjects had at least 10 natural teeth and were over 18 years of age. Periodontal clinical measurements were performed at six sites per tooth and included probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), presence or absence of supragingival biofilm (SB), bleeding on probing (BOP) and suppuration (SUP). After initial clinical evaluation, subjects were categorized as periodontally healthy (N =56) or periodontitis (N = 169). The healthy controls they had no sites with

PD and/or CAL > 3mm and no more than 10% of sites with BOP. Periodontitis patients presented at least 10% of teeth with PD and/or CAL \geq 5 mm, or at least 15% of teeth with PD and /or CAL \geq 4mm, and > 10% of sites with BOP. Subjects with evidence of destructive periodontal disease received full mouth scaling and root planning under local anesthetic and instructions in proper home care procedures.

Sampling

After removal of supragingival biofilm with a sterile gauze, individual subgingival biofilm samples were taken from 2 to 6 sites with PD \geq 4 mm in the periodontitis patients, and 3 randomly selected sites with PD \leq 4 mm and no BOP in the subjects with periodontal health using sterile periodontal curettes. Each sample was placed in Eppendorf tubes containing 200 μ L of TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6). For saliva samples, patients were not allowed to clean their teeth or to eat 30 minutes before sampling. They rinsed out their mouths with 10 mL of 0.9% sterile saline for 60 seconds, and the mouthwashes were collected in sterile plastic recipients. All samples were stored in a freezer at -20 °C.

Isolation of bacterial DNA

Bacterial DNA was extracted from saliva and subgingival biofilm samples according to the methodology described by Laine *et al.* (16). Briefly, samples were centrifuged at 300 x g for 10 minutes. The pellet was washed twice in 0.9% saline, re-suspended in 100 mL of 50 mM NaOH and boiled for 10 minutes. Samples were then neutralized with 14 mL of 1 M Tris (pH 7.5) and centrifuged at 14.000 x g for 3 minutes. Supernatants were collected and stored at -20 °C until PCR amplification was performed.

Detection of *H. pylori* by PCR

For PCR detection of *H. pylori*, the pair of primers JW22/JW23 (5'-CGTTAGCTGCATTACTGGAGA -3' and 5'-GAGCGCGTAGGCGGGATAGTC - 3') was used (26). A negative control with no DNA template and a positive control consisting of DNA obtained from the *H. pylori* strain ATCC 43629 were used in all reactions. The PCR reaction was performed in a 25 µL reaction mixture containing 2.5 µL of 10 X PCR buffer (Promega, Madison, WI, USA), 1.5 mM of MgCl₂, 0.5 µL of desoxynucleotide triphosphate mixture (final concentration 0.2 mM each dATP, dCTP, dTTP and dGTP, Promega), 1.25 units of Go Taq (Promega) and 10 µL of DNA template. The reaction was performed in a thermal cycler Primus 25/96, MWG (Biotech, Ebersberg, Germany). The initial denaturation step occurred at 94 °C for 5 minutes, and was followed by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 1 minute, annealing at 60 °C for 1 minute, extension at 72 °C for 1 minute, and a final extension at 72 °C for 1 minute. The products obtained were analyzed on a 2% agarose gel electrophoresis performed at 4V/cm in Tris-acetate-EDTA buffer (TAE). The gel was stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide and visualized on an ultraviolet transilluminator. The expected product after amplification was 295 bp in length (Fig. 1). A 100 bp ladder digest (Biolabs, New England) was used as a standard molecular weight. A pair of ubiquitous bacterial primers (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' and 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT- 3') designed by Willis *et al.* (38), which match almost all bacterial 16S RNA genes at the same position but not 18S RNA genes from eukaryotic cells, was used to indicate the presence of bacterial DNA in the clinical samples, particularly the ones that were *H. pylori*-negative. For the reaction using the universal 16S rDNA primers, PCR amplification included a 25 µL reaction mixture containing 0.2 mM of forward and reverse universal primers, 2.5 µL of 10X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 1.25 U of Go Taq, and 200 mM of each deoxynucleosidetriphosphate (Promega). The PCR temperature profile included an initial denaturation step at 97°C for 1 min, followed by 30 cycles of a denaturation step at 97°C for 45 s, a primer annealing step at 55°C for 45 s, an extension step at 72°C for 1 min and a final step of 72°C for 4 min. The presence of bacterial DNA was determined by an amplicon of 1505 bp in size visualized on a 1.5% agarose gel (Fig 1).

All statistical tests were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), release 10.0. Full-mouth clinical measurements were computed for each subject and then average across subjects within the groups. Differences on clinical parameters between groups were sought using Mann-Whitney and χ^2 tests. The frequency of detection of *H. pylori* was computed for each sample and subject, and significant differences between groups were sought using the χ^2 and Fisher's exact tests. Associations between periodontal parameters and frequency of *H. pylori* were examined by correlation coefficient of Spearman. Any difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

In the present study, we evaluated the presence of *H. pylori* in saliva and subgingival biofilm of individuals without gastric symptoms presenting chronic periodontitis or periodontal health using the PCR technique. The demographic and periodontal clinical features of the subject groups are shown in Table 1. All clinical parameters of periodontal tissue destruction and inflammation (tooth loss, PD, CAL, BOP, SB and SUP) were significantly greater in the periodontitis group compared to controls ($p < 0.01$; Mann-Whitney test). No significant differences between groups were observed for gender or age. Overall, *H. pylori* was detected in 24% of all samples. A higher prevalence of this species was found in subgingival biofilm (33.3%) in relation to saliva samples (20%; $p = 0.03$, Fisher's exact test). This difference was quite significant within the periodontitis group (saliva = 23.5% versus biofilm = 50%; $p = 0.001$, Fisher's exact test). The frequency of *H. pylori* in both clinical groups is depicted in Figures 2 and 3. In saliva samples, a significant higher prevalence of *H. pylori* was observed in periodontitis subjects (23.5%) compared to periodontally healthy controls (7.3%) ($p = 0.027$; Fisher's exact test, Fig. 2). Likewise, *H. pylori* was detected significantly more often in subgingival biofilm samples from periodontitis patients (50%) compared to controls (11.4%) ($p < 0.001$; Fisher's exact test, Fig. 3). Significant positive correlations were observed between presence of *H. pylori* and PD ($\rho = 0.215$, $p < 0.001$), CAL ($\rho = 0.255$, $p < 0.001$), BOP ($\rho = 0.200$, $p < 0.001$), PL ($\rho = 0.215$, $p < 0.001$), and SUP ($\rho = 0.217$, $p < 0.001$).

Discussion

Studies have suggested that the oral cavity may be a reservoir for *H. pylori*, and that failure to eliminate this species from the mouth could lead to recolonization and reinfection in the stomach (4, 9, 18, 20, 21, 22, 26,30, 32, 33). Other authors believe that this bacterium has only a transient presence in the oral environment (3, 6, 23, 25). It is possible that the prevalence of *H. pylori* in the oral cavity is affected by the presence of oral infection (8). Data correlating periodontal infection and *H. pylori* colonization are limited (8, 10, 11, 29, 36). Our results support the data in the literature showing the presence of *H. pylori* in different clinical samples from the oral cavity, particularly in subgingival biofilm of patients with chronic periodontitis and poor oral hygiene (8, 10, 11, 21, 29, 36). Riggio &

Lennon (29) observed *H. pylori* in the subgingival biofilm of 38% of the individuals with periodontitis, whereas Gebara *et al.* (10) and Dye *et al.* (8) detected the bacterium in 26.6% and 41% of these patients, respectively. The great diversity of biological surfaces in the oral cavity provides many ecological sites for colonization with a variety of bacterial species (17). The salivary microbiota represents mostly the dorsal and lateral surfaces of the tongue. In contrast, the biofilms colonizing the supra and subgingival area of the teeth are somewhat similar to each other but quite different from the microbiotas on the oral soft tissue surfaces and in saliva (17). Thus, the lower prevalence of *H. pylori* observed in saliva compared to subgingival biofilm samples suggest that this species may prefer the subgingival microenvironment than other niches in the oral cavity for colonization. In fact, Oshowo *et al.* (26) did not find this bacterium in any saliva sample they examined. Other investigators have reported similar frequencies (10% to 23%) of *H. pylori* in saliva (10, 18). Conversely, Song *et al.* (32) detected this species in 55% of saliva samples, but the periodontal *status* of the patients was not reported. One could argue that the periodontal pocket presents a very rich environment for the colonization of *H. pylori*. The complex and diverse microbiota together with the persistent inflammatory process may provide a wide range of nutrients and binding sites for the establishment of this microorganism. Close related species such as the *Campylobacter spp.* have been shown to increase in frequency and levels in sites with deep PD, loss of periodontal attachment and BOP (31). These species and species of *Prevotella* and *Fusobacterium* have been described as members of the “orange complex” (31). This microbial complex sets the stage for the colonization by another complex, the “red complex”, consisting of three periodontal pathogens (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia*). These two complexes have been associated with periodontal inflammation and tissue destruction (31). Thus, species within the subgingival biofilm present quite complex interrelationships (15). For instance, Andersen *et al.* (2) reported that *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium periodonticum* and *Porphyromonas gingivalis*, members of the orange and red complexes, were found to coaggregate with *H. pylori*. *Fusobacterium spp.* have been described as key microorganisms in the process of co-aggregation among different genera of facultative bacteria, precursors of the dental biofilm formation, and strictly anaerobic bacteria, the following colonizers (15). These species produce several metabolites such as formate and fumarate

that are utilized as energy source by species of *Campylobacter* and *Wollinella* (28). Thus, colonization by *Fusobacterium* does seem to favor the establishment of *H. pylori* in the periodontal environment. Moreover, subgingival biofilm can provide significant amount of urea, which can select for urease-producing bacteria such as *H. pylori*. Antagonistic relationships may also occur within the subgingival biofilm. Okuda *et al.* (24) observed that *Streptococcus oralis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Actinomyces naeslundii*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* produce bacteriocin-like inhibitory proteins against *H. pylori*. The fact that good oral hygiene patients harbor less *H. pylori* in their mouth could also be explained by this inhibitory activity of dental biofilm early colonizers such as oral streptococci over that species. Clinically, our control subjects demonstrated minimal signs of dental biofilm accumulation and gingival inflammation (Table 1) compatible with adequate oral hygiene.

Differences in the frequency of H. pylori oral carriage observed in the literature may result from differences in the study population, oral status, H. pylori infection, type and number of clinical samples, and methods of detection. One aspect that should be considered regarding these differences is the classification of periodontal disease. This has been a controversial issue in many clinical or microbiological studies in Periodontology (37). Only Dye et al. (8) and Gebara et al. (10) reported the criteria for defining periodontitis. As it has been suggested (27), we performed a full mouth clinical examination (6 sites per tooth) in order to determine more precisely periodontal disease or health. Our results clearly demonstrated a moderate to advanced periodontal destruction in the diseased subjects (Table 1). In addition, except for the paper by Dye et al. (8) who evaluated over 4,000 subjects, we have examined a much larger number of samples/patients in comparison to other investigations (10, 11, 19, 29). Regarding the detection method employed, PCR has been shown to be a very sensitive method for H. pylori detection, although specificity and sensitivity may vary among sets of primers (6) The primers used in this study (JW22 and JW23) have been previously tested for their specificity and sensitivity (10, 11, 19, 29, 36). Both periodontitis and H. pylori infection may be influenced by some risk indicators such as age, gender, ethnicity and socio-economic status (1, 13). Associations between age or gender and the frequency of H. pylori demonstrated a slightly greater

prevalence in males (31%) than in females (21%), as well as in older individuals (> 50 years of age; 31%) in relation to younger patients (18 – 30 years of age; 13.5%), although these differences were not significant. In a large epidemiological study, Dye et al. (8) found a significant association between the prevalence of *H. pylori* and advanced periodontal disease even after adjusting for these sociodemographic factors.

In the current investigation, our main goal was to determine whether the oral cavity could act as a reservoir for *H. pylori* regardless infection in the stomach. Furthermore, we wanted to associate this carriage state with the presence of periodontal infection. Therefore, we evaluated patients who reported no history of gastric symptoms related or not to *H. pylori* infection, in contrast to most of the studies reported (9, 10, 21, 20, 32, 33). Berroteran et al. (5) detected *H. pylori* in biofilm of 15% of asymptomatic subjects studied., while Martinez-Gomes et al. (19) did not detected this bacterium in any of the 10 non-dyspeptic subjects evaluated. We found a much higher overall prevalence (24%) in our non-dyspeptic population. Conversely, Olivier et al. (25) did not detect *H. pylori* in dental samples from non-periodontitis subjects who tested positive in the stomach biopsies. Interestingly, Umeda et al. (36) have reported that a patient with periodontal pockets retained *H. pylori* in the oral cavity even after eradication of the bacterium from the stomach. Similarly, Gebara et al. (11) showed that 60% of patients with periodontal disease were still positive for DNA of *H. pylori* in their mouths, whereas only 10% were positive in the stomach after triple therapy. These controversial findings may suggest that the frequency of *H. pylori* in oral cavity is more related to the presence of periodontal disease than to the existence of gastric infection.

Although the oral cavity has been shown to be a reservoir for *H. pylori*, our findings provide additional evidence for the role of subgingival biofilm of periodontitis patients as a source of infection. Considering that eradication of this species from dental biofilm may be limited, close attention should be given to periodontitis patients who may harbor *H. pylori* in the oral cavity in order to reduce the risk for development of infection in the stomach.

Acknowledgments

This work was supported in part by National Council for Scientific and technological Development (CNPq), Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) and Program of Research Support for Groups of Excellence (PRONEX), Brazil.

References

1. Albandar JM. Epidemiology and risk factors of periodontal diseases. *Dent Clin North Am* 2005; **49**: 517-532.
2. Andersen RN, Ganeshkumar N, Kolenbrander PE. *Helicobacter pylori* adheres selectively to *Fusobacterium spp.* *Oral Microbiol Immunol* 1998; **13**: 51-54.
3. Asikainen S, Chen C, Slots J. Absence of *Helicobacter pylori* in subgingival samples determined by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1994; **9**: 318-320.
4. Avcu N, Avcu F, Beyan C, Ural A, Kaptan K, Ozyurt M. The relationship between gastric-oral *Helicobacter pylori* and oral hygiene in patients with vitamin B-12 deficiency anemia. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; **92**: 166-169.
5. Berroteran A, Perrone M, Correnti M, Cavazza, ME, Tombazzi C, Lecuna V. Detection of *Helicobacter pylori* DNA in the oral cavity and gastroduodenal system of a Venezuelan population. *J Med Microbiol* 2002; **51**: 764-770.
6. Cammarota G, Tursi A, Montalto M, Papa A, Veneto G, Bernardi S. Role of dental plaque in the transmission of *Helicobacter pylori* infection. *J Clin Gastroenterol* 1996; **22**: 174-177.
7. Dixon MF. *Helicobacter pylori* and peptic ulceration: Histopathological aspects. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; **6**: 125-130.
8. Dye BA, Kruszon-Moran D, Mc Quillan D. The relationship between periodontal disease attributes and *Helicobacter pylori* infection among adults in the United States. *Am J Public Health* 2002; **92**: 1809-1815.
9. Ferguson DA, Jr Chuanfu LI, Patel NR, Mayberry WR, Chi DS, Thomas E. Isolation of *Helicobacter pylori* from saliva. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 2802-2804.

10. Gebara ECE, Pannuti C, Faria CM, Chehter L, Mayer MPA, Lima, LAPA. Prevalence of *Helicobacter pylori* detected by polymerase chain reaction in the oral cavity of periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2004; **19**: 277-280.
11. Gebara ECE, Faria CM, Pannuti C, Chehter L, Mayer MPA, Lima LAPA. Persistence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity after systemic eradication therapy. *J Clin Periodontol* 2006; **33**: 329-333.
12. Genta RM, Hammer HW, Graham DY. Gastric lymphoid follicles in *Helicobacter pylori* infection: Frequency, distribution, and response to triple therapy. *Hum Pathol* 1993; **24**: 577-583.
13. Goodman KJ, Correa P. The transmission of *Helicobacter pylori*. A critical review of the evidence. *Int J Epidemiol* 1995; **24**: 875-877.
14. Graham DY. *Helicobacter pylori*: Its epidemiology and its role in duodenal ulcer disease. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; **6**: 105-113.
15. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993; **175**: 3247-3252.
16. Laine MJ, Farre MA, Crusius BA, Pena S. The mouthwash: an non- invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J. Periodontol* 2000; **71**: 1315-1318.
17. Mager DL, Haffajee AD, Socransky SS. Effects of periodontitis and smoking on the microbiota of oral mucous membranes and saliva in systemically healthy subjects. *J Clin Periodontol* 2003; **30**: 1031-1037.
18. Mapstone NP, Lynch DAF, Lewis FA, Axon ATR., Tompkins DS, Dixon MF. Identification of *Helicobacter pylori* DNA in the mouths and stomachs of patients with gastritis using PCR. *J Clin Pathol* 1993; **46**: 540-543.
19. Martinez-Gomes J, Diouf A, Lakhssassi N, Sixou M. Absence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity of 10 non-dyspeptic subjects demonstrated by real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiol and Immunol* 2006; **21**: 407-410.
20. Miyabayashi H, Furihata K, Shimizu T, Ueno I, Akamatsu T. Influence of oral *Helicobacter pylori* on the success of eradication therapy against gastric *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2000; **5**: 30-37.

21. Nguyen AM, Engstrand L, Genta RM, Graham DY, El-Zaatari FAK. Detection of *Helicobacter pylori* in dental plaque by reverse transcription polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1993; **31**: 783-787.
22. Nguyen AM, El-Zaatari FAK, Graham, DY. *Helicobacter pylori* in the oral cavity. A critical review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; **79**: 705-709.
23. Okuda K, Ishihara K, Myura T, Katakura A, Noma H, Ebihara Y. *Helicobacter pylori* may have only a transient presence in the oral cavity and on the surface of oral cancer. *Microbiol Immunol* 2000; **44**: 385 - 388.
24. Okuda K, Kimizuka R, Katakura A, Nakagawa T, Ishihara K. Ecological and immunopathological implications of oral bacteria in *Helicobacter pylori*-infected disease. *J Periodontol* 2003; **74**: 123-128.
25. Olivier BJ, Bond RP, van Zyl WB, Delpont M, Slavik T, Zyadi C, van der Merwe SW. Absence of *Helicobacter pylori* within the oral cavities of members of a healthy South African community. *J Clin Microbiol* 2006; **44**: 635-636.
26. Oshowo A, Gillam D, Botha A, Turnio M, Holton J, Boulos, P. *Helicobacter pylori*: The mouth, stomach and gut axis. *Ann Periodontol* 1998; **3**: 276-280.
27. Papapanou PN. Periodontal diseases: epidemiology. *Ann Periodontol* 1996; **1**: 1-36.
28. Paster BJ, Gibbons RJ. Chemotactic response to formate by *Campylobacter concisus* and its potential role in gingival colonization. *Infect Immun* 1986; **52**: 378-383.
29. Riggio MP, Lennon A. Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients. *J Med Microbiol* 1999; **48**: 317-322.
30. Shames B, Kraiden S, Fuksa M, Babida C, Penner JL. Evidence for the occurrence of the same strain of *Campylobacter pylori* in the stomach and dental plaque. *J Clin Microbiol* 1989; **27**: 2849-2850.
31. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; **25**: 134-144.
32. Song Q, Lange T, Spahr A, Adler G, Bode G. Characteristic distribution pattern of *Helicobacter pylori* in dental plaque and saliva detected with nested PCR. *J Med Microbiol* 2000; **49**: 349-353.

33. Song Q, Haller B, Ulrich D, Wichelhaus A, Adler G, Bode G. Quantification of *Helicobacter pylori* in dental plaque samples by competitive polymerase chain reaction. *J Clin Pathol* 2000; **53**: 218-222.
34. Souto R, de Andrade AFB, Uzeda M, Colombo APV. Prevalence of “non-oral” pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol* 2006; **37**: 208-215.
35. Tytgat GN, Noach LA, Rauws EA. *Helicobacter pylori* infection and duodenal ulcer disease. *Gastroenterol Clin North Am* 1993; **22**: 127-139.
36. Umeda M, Kobayashi H, Takeuchi Y, Hayashi, J, Mototome-Hayashi, Y, Yano K. High prevalence of *Helicobacter pylori* detected by PCR in the oral cavities of periodontitis patients. *J Periodontol* 2003; **74**: 129-134.
37. Van der Velden U. Purpose and problems of periodontal disease classification. *Periodontol 2000* 2005; **39**: 13-21.
38. Willis SG, Smith KS, Dunn VL, Gapter, LA., Riviere KH, Riviere GR. Identification of seven *Treponema species* in health-and disease-associated dental plaque by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; **37**, :867-869.
39. Wotherspoon AC, Ortiz-Hidalgo C, Falzon MR, Isaacson PG. *Helicobacter pylori* –associated gastritis and primary B-cell gastric lymphoma. *Lancet* 1991; **338**: 1175-1176.

Table 1. Demographic and full-mouth clinical parameters (mean \pm SD) of Periodontally Healthy (PH) and Chronic Periodontitis (CP) subjects selected for the study.

Parameters	PH (N = 56)	CP (N = 169)
Age (years)	34.3 \pm 12	41 \pm 14
(%) Males	35.5	34.2

N of missing teeth *	0.6 ± 1.5	5.2 ± 5.3
Probing depth (mm) *	2.1 ± 0.5	3.2 ± 1.2
Clinical attachment level (mm) *	2.2 ± 0.6	3.9 ± 1.5
<i>% sites with:</i>		
Bleeding on probing *	1.9 ± 4.1	47.2 ± 29
Supragingival biofilm *	10.1 ± 10	49 ± 30
Suppuration *	0	3 ± 10

* Refers to $p < 0.01$, Mann-Whitney test; † refers to $p < 0.01$, χ^2 test.

Figure 1. Photo of an ethidium bromide stained agarose gel of PCR products for *H. pylori* detection. Lanes 1- 100 bp ladder; 2- positive control *H. pylori* ATCC 43629; 3- *H. pylori* - positive saliva sample; 4- *H. pylori* - negative saliva sample; 5- *H. pylori* - negative saliva sample positive for bacterial DNA; 6- *H. pylori* - positive subgingival biofilm sample; 7- *H. pylori* - negative subgingival biofilm sample; 8- *H. pylori* - negative subgingival biofilm sample positive for bacterial DNA; 9- negative control.

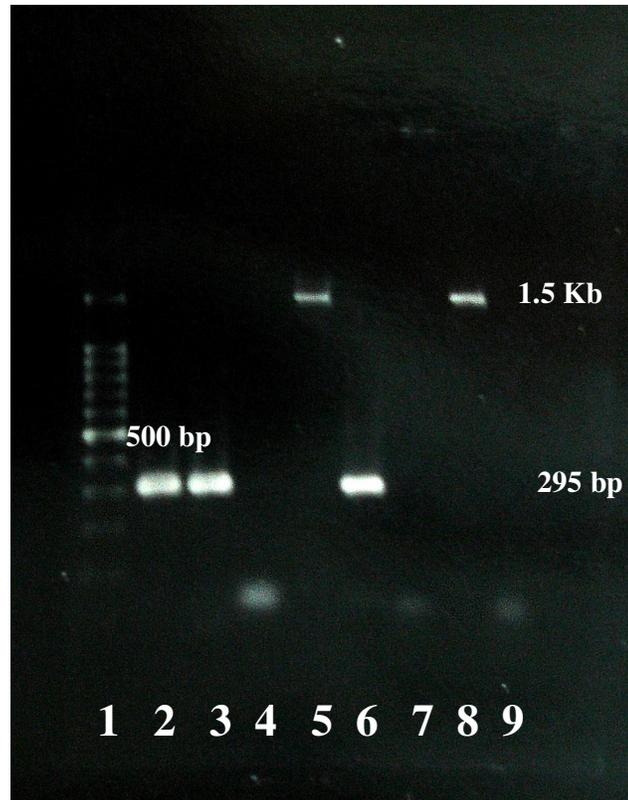


Figure 2. Frequency of detection of *Helicobacter pylori* in saliva samples from periodontally healthy (n=56) and chronic periodontitis subjects (n = 169). * Refers to significant difference between groups (Fisher's exact test).

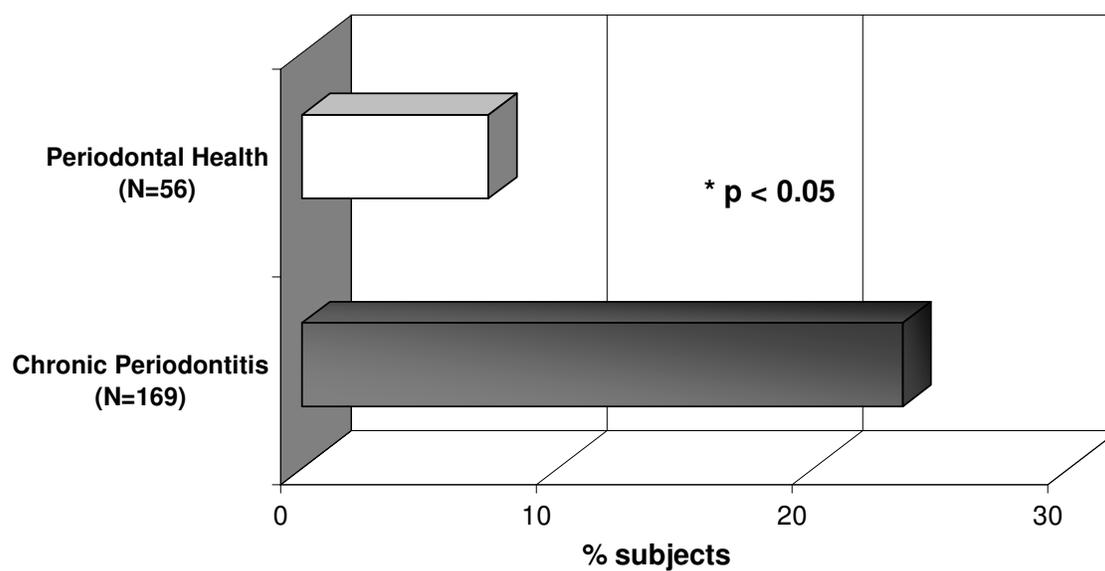
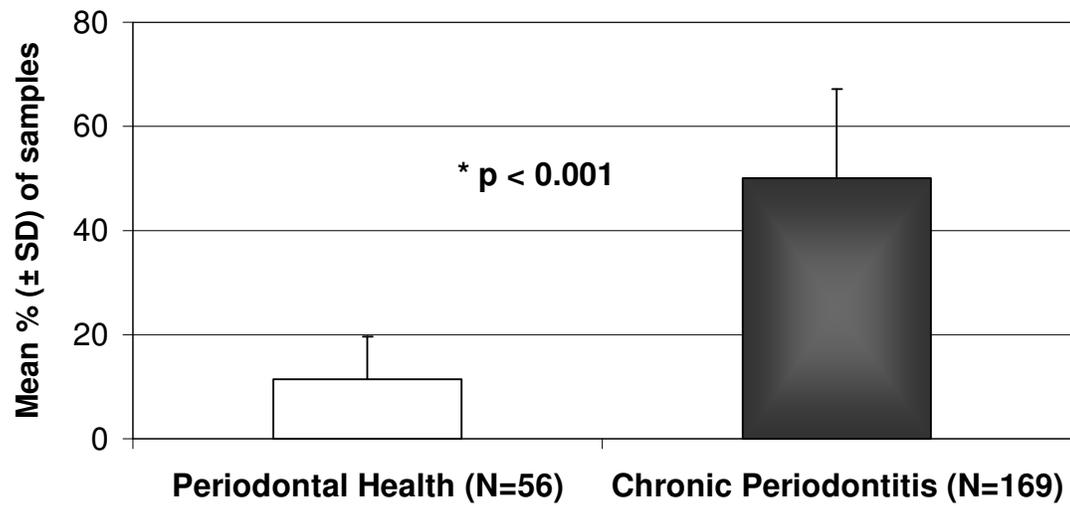


Figure 3 . Mean frequency (\pm SD) of detection of *Helicobacter pylori* in subgingival biofilm samples from periodontally healthy (n=56) and chronic periodontitis subjects (n = 169). The frequency of the bacterium was computed for each patient and average within the groups.

*Refers to significant difference between groups (Mann-Whitney test).



Anexo 5

ARTIGO 2

Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontitis

Renata Souto MSD*¹, Ana Paula Vieira Colombo DMSc¹

¹Institute of Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ); Rio de Janeiro;
Brazil

Abstract

Background and Aims: Enterococci are increasingly associated with nosocomial infections and opportunistic infections involving the oral cavity. This study investigated the prevalence of *E. faecalis* in subgingival biofilm and saliva of patients with periodontal disease.

Methods: Samples were obtained from 56 periodontally healthy and 169 chronic periodontitis subjects. DNA was extracted from the samples and detection of *E. faecalis* was carried out by polymerase chain reaction.

Results: In general, *E. faecalis* was detected in 34.9% of all samples evaluated. No significant difference in prevalence of this species between subgingival biofilm (34.6%) and saliva (35.1%) samples was observed. *E. faecalis* was detected significantly more often in saliva and subgingival samples of periodontitis patients (40.5% and 47.8%, respectively) compared to controls (14.6% and 17.1%, respectively; $p < 0.05$). Moreover, significant positive correlations were observed between the presence of *E. faecalis* and clinical parameters of probing depth, clinical attachment level, bleeding on probing and plaque accumulation ($p < 0.001$).

Conclusion: The present data showed that *E. faecalis* is frequently detected in the oral microbiota of periodontitis patients suggesting that periodontal infection may favor the colonization by this species. Close attention should be given to these patients regarding the risk for development of *E. faecalis* infection in other sites of the body.

Key Words: *Enterococcus faecalis*; subgingival biofilm, saliva, periodontitis, PCR

1. Introduction

Enterococci are gram-positive cocci that inhabit the gastrointestinal tract, the oral cavity, and the vagina in humans as normal commensals. They can cause a variety of diseases in humans, infecting the urinary tract, bloodstream, endocardium, abdomen, biliary tract, burn wounds, and indwelling foreign devices.¹ Enterococci now rank among the top three nosocomial bacterial pathogens,² and strains resistant to currently available antibiotics pose real therapeutic difficulties.³ Up to 90% of enterococcal infections in humans are caused by *Enterococcus faecalis*.

Data on oral prevalence of *E. faecalis* vary widely in different studies.⁴⁻¹⁰ The presence of *E. faecalis* in the oral cavity raises the question of whether the mouth could be a source for infection with this microorganism. Moreover, it seems conceivable that the oral status influences directly or indirectly the colonization by *E. faecalis*.¹⁰ For instance, enterococci were detected in samples from multiple oral sites in 60% of schoolchildren with high caries activity and 75% of patients with endodontic infection.⁵ More recently, Sedgley and co-workers⁹ reported the presence of *E. faecalis* in 29% of oral rinse samples, 55% of tongue dorsum and 22% of gingival sulcus samples from 41 endodontic subjects. This species has been indicated as the species most commonly recovered from teeth with failed endodontic treatment and persistent infection.^{11,12}

In particular, individuals with periodontal diseases may harbor higher proportions and levels of several bacterial pathogens of medical importance in relation to periodontally healthy individuals.^{4,10,13} However, very few studies have evaluated the correlation between the prevalence of *E. faecalis* and periodontal diseases.^{4,6,10} In view of the limited data, the aim of this study was to determine the carriage rate of *E. faecalis* in subgingival biofilm and saliva from patients with periodontal health or chronic periodontitis by polymerase chain reaction (PCR).

2. Materials and methods

2.1. Subject Population and Clinical Examination

Two hundred and twenty five adult subjects who sought dental treatment at the Dental School of the Federal University of Rio de Janeiro, Brazil were recruited for the study. Informed consent was obtained from all enrolled individuals. The study protocol was approved by the Review Committee for Human Subjects for Human Subjects of the Clementino Fraga filho University Hospital. Exclusion criteria included pregnancy, use of local or systemic antimicrobial agents within 6 months prior to the entry into the study, smoking, diabetes, and other systemic conditions that could affect the periodontal *status*. All subjects had at least 10 natural teeth and were over 18 years of age. Periodontal clinical measurements were performed at six sites per tooth and included probing depth (PD), clinical attachment level (CAL), presence or absence of supragingival biofilm (SB), bleeding on probing (BOP) and suppuration (SUP). After initial clinical evaluation, subjects were categorized as periodontally healthy (N =56) or periodontitis (N = 169). The healthy controls had no sites with PD and/or CAL > 3 mm and no more than 10% of sites with BOP. Periodontitis patients presented at least 10% of teeth with PD and/or CAL \geq 5 mm, or at least 15% of teeth with PD and /or CAL \geq 4mm, and > 10% of sites with BOP. Subjects with evidence of destructive periodontal disease received full mouth scaling and root planning under local anesthetic and instructions in proper home care procedures.

2.2. Sampling

After removal of supragingival biofilm with sterile gauze, individual subgingival biofilm samples were taken from 2 to 6 sites with PD \geq 4 mm in the periodontitis patients, and 3 randomly selected sites with PD \leq 4 mm and no BOP in the subjects with periodontal health

using sterile periodontal curettes. Each sample was placed in Eppendorf tubes containing 200 μ L of TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.6). For saliva samples, patients were not allowed to clean their teeth or to eat 30 minutes before sampling. They rinsed out their mouths with 10 mL of 0.9% sterile saline for 60 seconds, and the mouthwashes were collected in sterile plastic recipients. All samples were stored in a freezer at -20 °C.

2.3. Isolation of bacterial DNA

Bacterial DNA was extracted from saliva and subgingival biofilm samples according to the methodology described by Laine et al.¹⁴ Briefly, samples were centrifuged at 300 x g for 10 minutes. The pellet was washed twice in 0.9% saline, re-suspended in 100 μ L of 50 mM NaOH and boiled for 10 minutes. Samples were then neutralized with 14 μ L of 1 M Tris (pH 7.5) and centrifuged at 14,000 x g for 3 minutes. Supernatants were collected and stored at -20 °C until PCR amplification was performed.

2.4. Detection of *E. faecalis* by PCR

For PCR detection of *E. faecalis*, the pair of primers 5'-GTTTATGCCGCATGGCATAAGAG -3' and 5'- CCGTCAGGGGACGTTTCAG - 3' was selected.¹² A negative control with no DNA template and a positive control consisting of DNA obtained from the *E. faecalis* strain ATCC 29212 were used in all reactions. The PCR reaction was performed in a 50 μ L reaction mixture containing 5 μ L of 10 X PCR buffer (Promega, Madison, WI, USA), 2 mM of MgCl₂, 1 μ L of desoxynucleotide triphosphate mixture (final concentration 0.2 mM each dATP, dCTP, dTTP and dGTP; Promega), 1.25 U of Go Taq (Promega) and 10 μ L of DNA template. The reaction was performed in a thermal cycler Primus 25/96, MWG (Biotech, Ebersberg, Germany). The initial denaturation step

occurred at 95 °C for 2 minutes, and was followed by 26 cycles of denaturation at 95 °C for 30 seconds, annealing at 60 °C for 1 minute, extension at 72 °C for 1 minute, and a final extension at 72 °C for 2 minutes. The products obtained were analyzed on a 1.5% agarose gel electrophoresis performed at 4V/cm in Tris-acetate-EDTA buffer (TAE). The gel was stained with 0.5 µg/mL ethidium bromide and visualized on an ultraviolet transilluminator. The expected product after amplification was 310 bp in length. A 100 bp ladder digest (Biolabs, New England) was used as a standard molecular weight. A pair of ubiquitous bacterial primers (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' and 5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT- 3') designed by Willis et al.¹⁵ was used to indicate the presence of bacterial DNA in the clinical samples, particularly the ones that were *E. faecalis*-negative. For the reaction using the universal 16S rDNA primers, PCR amplification included a 25 µL reaction mixture containing 0.2 mM of forward and reverse universal primers, 2.5 µL of 10X PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 1.25 U of Go Taq, and 200 mM of each deoxynucleosidetriphosphate (Promega). The PCR temperature profile included an initial denaturation step at 97°C for 1 min, followed by 30 cycles of a denaturation step at 97°C for 45 s, a primer annealing step at 55°C for 45 s, an extension step at 72°C for 1 min and a final step of 72°C for 4 min. The presence of bacterial DNA was determined by an amplicon of 1505 bp in size visualized on a 1.5% agarose gel.

2.5. Statistical Analysis

All statistical tests were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Inc[®].v.10 Chicago, IL, USA). Full-mouth clinical measurements were computed for each subject and then average across subjects within the groups. Differences on clinical parameters between groups were sought using Mann-Whitney and χ^2 tests. The frequency of detection of *E. faecalis* was computed for each sample and subject, and

significant differences between groups were sought using the χ^2 and Fisher's exact tests. Associations between periodontal parameters and frequency of *E. faecalis* were examined by correlation coefficient of Spearman. Any difference of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

The demographic and periodontal clinical features of the subject groups are shown in Table 1. All clinical parameters of periodontal tissue destruction and inflammation (tooth loss, PD, CAL, BOP, SB and SUP) were significantly greater in the periodontitis group compared to controls ($p < 0.01$; Mann-Whitney test). No significant differences between groups were observed for gender or age. Overall, *E. faecalis* was detected in 34.9% of all samples. No significant differences in prevalence of this species between subgingival biofilm (34.6%) and saliva (35.1%) samples were observed (data not shown). The frequency of *E. faecalis* in both clinical groups is depicted in Figures 1 and 2. In saliva samples, a significant higher prevalence of *E. faecalis* was observed in periodontitis subjects (40.5%) compared to periodontally healthy controls (14.6%) ($p < 0.01$; Fisher's exact test, Fig. 1). Likewise, *E. faecalis* was detected significantly more often in subgingival biofilm samples from periodontitis patients (47.8%) compared to controls (17.1%) ($p < 0.01$; Fisher's exact test, Fig. 2). Significant positive correlations were observed between presence of *E. faecalis* and PD ($\rho = 0.180$, $p < 0.01$), CAL ($\rho = 0.215$, $p < 0.001$), BOP ($\rho = 0.226$, $p < 0.001$), and PL ($\rho = 0.244$, $p < 0.001$).

4. Discussion

In the last decades, several studies have focused on the relationship between periodontal diseases and oral bacteria and systemic diseases.¹⁶ Likewise, bacterial pathogens that cause medically important diseases may colonize the oral cavity.^{4,10,13} The present investigation examined subgingival biofilm and saliva samples from patients with chronic periodontitis and periodontal health for the presence of *E. faecalis* using the PCR technique. According to the literature,⁴⁻¹⁰ we detected *E. faecalis* in a quite high prevalence (34.9%) in oral samples of all subjects. Conceivably, the frequency of *E. faecalis* in the oral cavity may be affected by the presence of oral infection. For instance, clinical studies have shown that enterococci usually make up a small proportion of the flora in the untreated root canal.^{12,17} However, enterococci have long been implicated in persistent root canal infections,^{12,17-19} and are the predominant species in root canals of teeth with failed endodontic treatment.¹¹⁻¹⁸ Enterococci have also been associated with mucosal lesion in immunocompromised patients.²⁰ Data correlating periodontal infection and *E. faecalis* colonization are limited. In general, the prevalence of *E. faecalis* in the oral cavity seems to get greater proportions in individuals with periodontitis.^{4,7,10} Our results showed a significantly higher frequency of *E. faecalis* in saliva (40.5%) and subgingival biofilm samples (47.8%) from periodontitis patients compared to periodontally healthy controls (14.6% and 17.1%, respectively), suggesting that the establishment of *E. faecalis* seems to be favored by the presence of a complex subgingival microbiota and periodontal inflammation.²¹ Similar data were reported by Colombo et al.⁴ who examined the presence and levels of *E. faecalis* in the subgingival microbiota of untreated periodontitis patients and healthy controls using the checkerboard method.²² In contrast, Rams et al.⁶ detected *E. faecalis* in only 1% of early-onset periodontitis

and 5.1% of chronic periodontitis patients by cultural methods, whereas Souto and co-workers¹⁰ found a much higher prevalence of this species (80%) in a large number of subgingival biofilm samples from periodontitis patients. In addition, these authors observed that this bacterium was much more prevalent in healthy sites from periodontitis patients as compared to sites in periodontally healthy patients.¹⁰ Differences in detection of *E. faecalis* observed in the literature may result from differences in the study population, oral *status*, type and number of clinical samples, and methods of detection. Studies have demonstrated that molecular biology methods are more effective than culture in detecting enterococci in different sources.^{23,24} There are many possible explanations for the higher frequency of *E. faecalis* detected by PCR when compared to culture. One reason is the ability of molecular methods to detect DNA from dead cells. However, it is highly unlikely that DNA from dead cells can remain intact in a complex background like the subgingival biofilm or saliva.²⁵ After cell death, the DNA molecule faces an onslaught of nucleases from other bacteria and fungi in the environment. Therefore, differences are more likely to be related to other factors, such as the higher sensitivity of molecular biology methods, particularly PCR. Molecular biology has emerged as a more effective, accurate and reliable for the detection of bacteria that are difficult to identify by conventional techniques, usually because of an uncommon phenotypic behavior,²⁶ and *E. faecalis* is not an exception.²⁷

Regarding epidemiological parameters, we did not find any correlation between age or gender and the detection of *E. faecalis* in this subject population. On the other hand, significant positive associations between clinical measurements of periodontal destruction and inflammation (PD, CAL, BOP and PL) and the presence of *E. faecalis* were obtained. These results suggest that this species may play a role in the severity and/or progression of periodontitis. Indeed, oral enterococci produce virulence factors of possible relevance to the pathogenesis of periodontitis,^{28,29} including extracellular elastase,³⁰ proteases³⁰ and

hemolysins capable of inducing neutrophil leukocyte dysfunctions.^{30,31} Moreover, *E. faecalis* may enhance pathogenicity in mixed infections with anaerobic bacteria,³² and is capable of inducing experimental apical periodontitis when in combination with other oral bacteria.^{33,34}

*The presence of enterococci in periodontitis lesions may have important therapeutic implications. Established pathogens in the dental biofilm may be more difficult to eradicate due to their higher resistance to antimicrobials and immunological defense mechanisms, increasing the probability of reinfection and treatment failure.³⁵ Enterococci originating from periodontal sites may seed into the bloodstream and act as a source for life-threatening septicemias in immunocompromised patients.³⁶ Furthermore, enterococcal beta-lactamases³⁷ may impair the efficacy of penicillins in the treatment of periodontitis. In vitro studies have reported the ability of *E. faecalis* to inactivate metronidazole.³⁸ Thus, anaerobic pathogens in *E. faecalis*-infected sites may be resistant to metronidazole at levels 4-8 times higher than the normal minimal inhibitory concentrations.³⁹*

In summary, the oral cavity has been shown to be a reservoir for *E. faecalis*. More importantly, our findings provide additional evidence for the association of this microorganism with the presence of periodontal infection. Considering that eradication of this species from subgingival biofilm in deep periodontal pockets may be limited, close attention should be given to these patients in order to reduce the risk for development of systemic diseases caused by *E. faecalis* in other areas of the body.

Acknowledgments

The authors wish to thank Dr. Carina Maciel da Silva, Department of Periodontology, for the support in collecting samples. This work was supported in part by National Council for Scientific and technological Development (CNPq), Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ) and Program of Research Support for Groups of Excellence (PRONEX), Brazil.

References

1. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 1994; **7**: 462-478.
2. Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2000; **21**: 510-515.
3. Hunt CP. The emergency of enterococci as a cause of nosocomial infection. *Br J Biomed Sci* 1998; **55**: 149-156.
4. Colombo AP, Teles RP, Torres MC, Souto R, Rosalém W, Mendes MCS, Uzeda M. Subgingival microbiota of brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002; **73**: 360-369.
5. Gold OG, Jordan HV, van Houte J. The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Arch Oral Biol* 1975; **20**: 473-477.
6. Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in humans periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992; **7**: 249-252.
7. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004; **19**: 95-101.

8. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol* 2005; **50**: 575-583.
9. Sedgley CM, Gwendolyn B, Appelbe O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006; **32**: 104-109.
10. Souto R, de Andrade AFB, Uzeda M, Colombo APV. Prevalence of “non-oral” pathogenic bacteria in subgingival biofilm of subjects with chronic periodontitis. *Braz J Microbiol* 2006; **37**: 208-215.
11. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; **31**: 1-7.
12. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; **30**: 315-320.
13. Slots J, Feik D, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Acinetobacter* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990; **5**: 149-154.
14. Laine MJ, Farre MA, Crusius BA, Pena S. The mouthwash: a non- invasive sampling method to study cytokine gene polymorphisms. *J Periodontol* 2000; **71**: 1315-1318.
15. Willis SG, Smith KS, Dunn VL, Gapter, LA., Riviere KH, Riviere GR. Identification of seven *Treponema species* in health-and disease-associated dental plaque by nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999; **37**: 867-869.
16. Reddy MS. Reaching a better understanding of non-oral disease and the implication of periodontal infections. *Periodontol 2000* 2007; **44**: 9-14.
17. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992; **7**: 257-262.

18. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral surg Oral Med Oral Pathol Ora Radiol Endod* 1998; **85**: 86-93.
19. Zoletti GO, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture dependent and -independent approaches. *J Endod* 2006; **32**: 722–726.
20. Wahlin YB, Holm A-K. Changes in the oral microflora in patients with acute leukemia and related disorders during the period of induction therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1988; **65**: 411–417.
21. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith CM, Kent Jr. RL. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998; **25**: 134-144.
22. Socransky SS, Smith CM, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin AE. “Checkerboard” DNA-DNA hybridization. *Biotech* 1994; **17**: 788-792.
23. Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Pruzzo C, Canepari P. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Lett Appl Microbiol* 2005; **40**: 289-294.
24. Paule SM, Trick WE, Tenover SC. Comparison of PCR assay to culture for surveillance detection of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 2003; **41**: 4805-4807.
25. Roberts AP, Mullany P. Genetic basis of horizontal gene transfer among oral bacteria *Periodontol 2000* 2006; **42**: 36–46
26. Tang YW, Ellis NM, Hopkins MK, Smith DH, Dodge DE, Persing DH. Comparison of phenotypic and genotypic techniques for identification of unusual aerobic pathogenic gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 1998; **36**:3674-3679.

27. Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 6123-6125.
28. Holt SC, Bramanti TE. Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991; **2**: 177-281.
29. Socransky SS, Haffajee AD. Microbial mechanisms in the pathogenesis of destructive periodontal diseases: a critical assessment. *J Periodontal Res* 1991; **26**:195-212.
30. Nord CE, Wadström T. Characterization of haemolytic enterococci isolated from oral infections. *Acta Odontol Scand* 1973; **31**: 387-393.
31. Novak RM, Holzer TJ, Liberin CR. Human neutrophil phagocytic killing of hemolysin-producing and non-hemolysin-producing *Enterococcus faecalis*. *Clin Res* 1988; **36**: 883A.
32. Brook I. Effect of *Streptococcus faecalis* on the growth of *Bacteroides* species and anaerobic cocci in mixed infections. *Surgery* 1988; **103**: 107-110.
33. Dahlén G, Fabricius L, Holm SE, Möller AJR. Circulating antibodies after experimental chronic infection in the root canal of teeth in monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; **90**: 338-344.
34. Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJR. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; **90**: 200-206.
35. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999; **11**: 217-221.
36. Bergmann OJ. Oral infections and septicemia in immuno-compromised patients with hematologic malignancies. *J Clin Microbiol* 1988; **26**: 2105-2109.
37. Murray BE, Church DA, Wanger A et al. Comparison of two β -lactamase-producing strains of *Streptococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; **30**: 861-864.
38. Nagy E, Földes J. Inactivation of metronidazole by *Enterococcus faecalis*. *J Antimicrob Chemother* 1991; **27**:63-70.

39. Nagy E, Werner H, Heizmann W. *In vitro* activity of daptomycin-metronidazole combinations against mixed bacterial cultures: reduced activity of metronidazole against *Bacteroides* species in the presence of *Enterococcus faecalis*. *Eur J Clin Microbiol* 1990; **9**: 287-292.

Table 1. Demographic and full-mouth clinical parameters (mean \pm SD) of Periodontally Healthy (PH) and Chronic Periodontitis (CP) subjects selected for the study.

Clinical Parameters	PH (N = 56)	CP (N = 169)
Age (years)	34.3 \pm 12	41 \pm 14
(%) Males [†]	35.5	34.2
N of missing teeth *	0.6 \pm 1.5	5.2 \pm 5.3
Probing depth (mm) *	2.1 \pm 0.5	3.2 \pm 1.2
Clinical attachment level (mm) *	2.2 \pm 0.6	3.9 \pm 1.5
<i>% sites with:</i>		
Bleeding on probing *	1.9 \pm 4.1	47.2 \pm 29
Supragingival biofilm *	10.1 \pm 10	49 \pm 30
Suppuration *	0	3 \pm 10

* Refers to $p < 0.01$, Mann-Whitney test; [†] refers to Chi-square test (not significant)

Figure legends.

Figure 1. Frequency of detection of *E. faecalis* in saliva samples from periodontally healthy (n=56) and chronic periodontitis subjects (n = 169). * Refers to significant difference between groups (Fisher's exact test).

Figure 2. Frequency of detection of *E. faecalis* in subgingival biofilm samples from periodontally healthy (n=56) and chronic periodontitis subjects (n = 169). *Refers to significant difference between groups (Fisher's exact test).

Figure 1

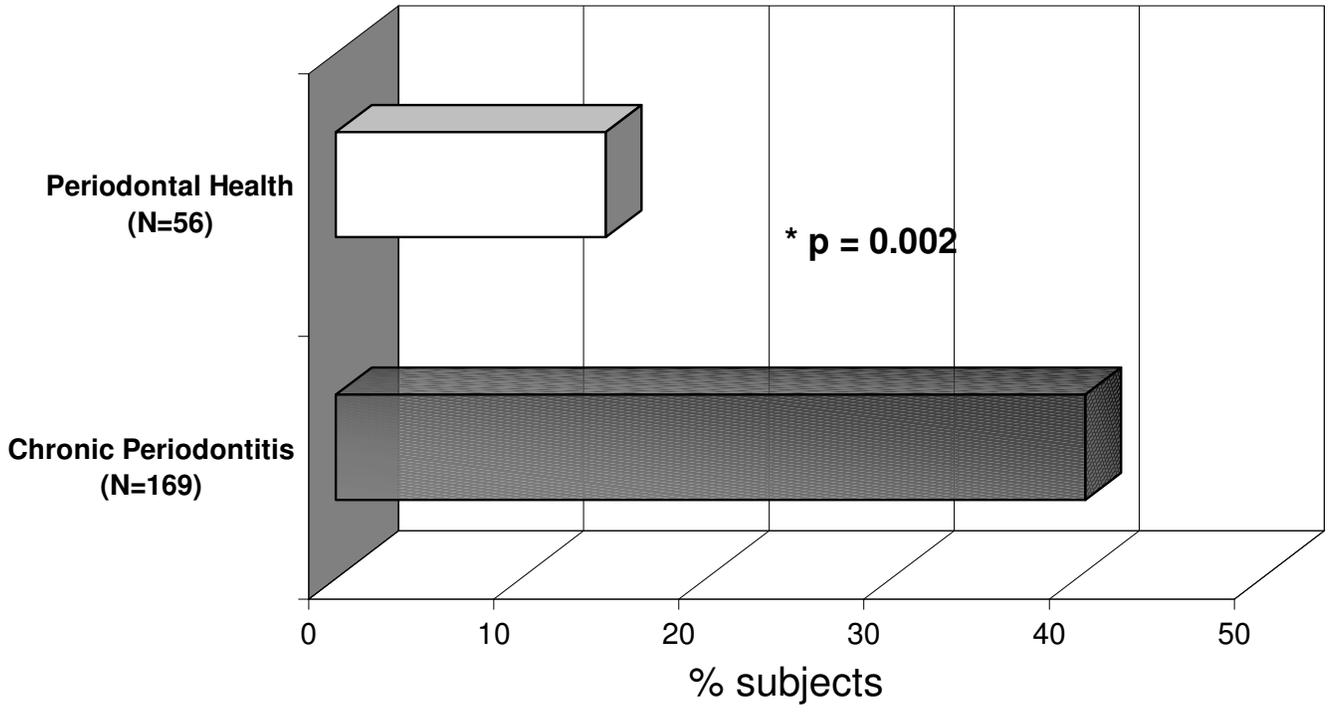
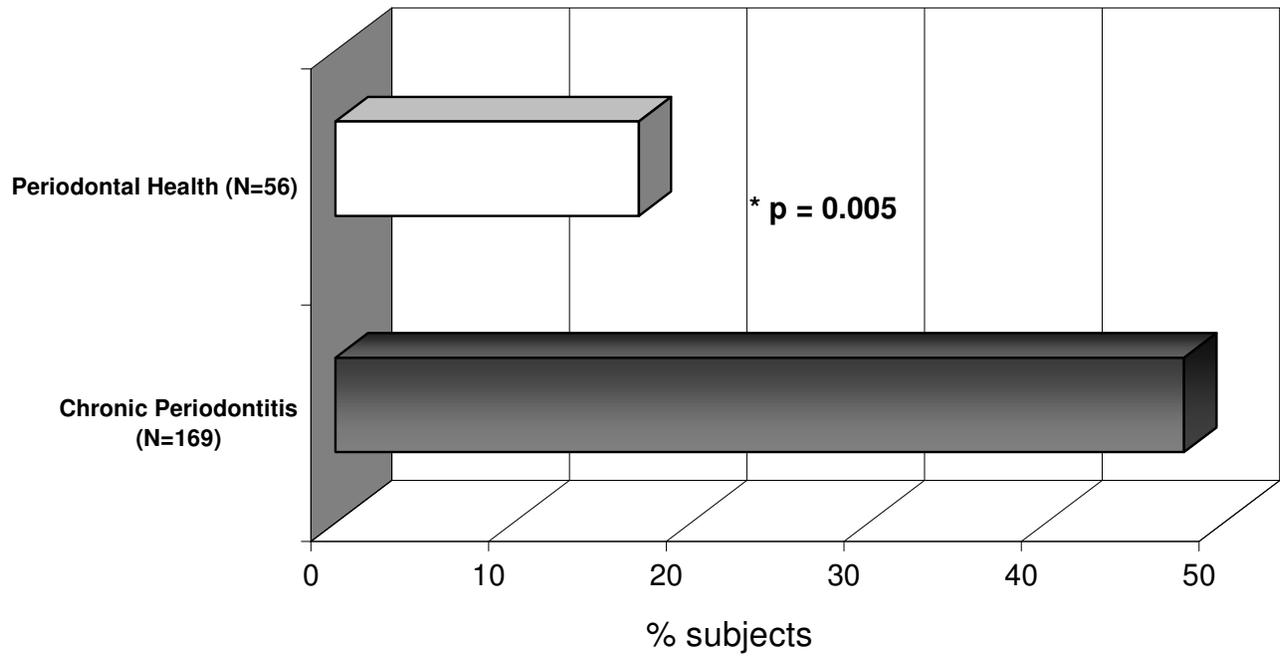


Figure 2



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)