

**Márcia Almeida Lana**

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE PERIODONTOPATÓGENOS  
EM SÍTIOS PERIODONTAIS DE PACIENTES COM E SEM DOENÇA  
PERIODONTAL POR CULTURA MICROBIOLÓGICA E POR  
REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA

Departamento de Microbiologia  
Instituto de Ciências Biológicas  
Universidade Federal de Minas Gerais  
2005

Márcia Almeida Lana

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE PERIODONTOPATÓGENOS EM SÍTIOS  
PERIODONTAIS DE PACIENTES COM E SEM DOENÇA PERIODONTAL POR  
CULTURA MICROBIOLÓGICA E POR REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO EM CADEIA

Tese apresentada ao Colegiado do  
Programa de Pós-graduação em  
Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais, como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências Biológicas (Microbiologia)

Orientador: Prof. Luiz de Macêdo Farias

Co-orientadores: Profa. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Prof. Edilberto Nogueira Mendes

**Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios**

Depto. de Microbiologia / ICB

**Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas**

Depto. de Propedêutica Complementar / Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

2005

043 Lana, Márcia Almeida.

Avaliação da ocorrência de periodontopatógenos em sítios periodontais de pacientes com e sem doença periodontal por cultura microbiológica e por reação de polimerização em cadeia [manuscrito] / Márcia Almeida Lana. – 2005.

145 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Luiz de Macêdo Farias. Co-orientadores: Profa. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho; Prof. Edilberto Nogueira Mendes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Doenças Periodontais. 3. Bactérias Anaeróbias. 4. Placa Dentária. I. Farias, Luiz de Macêdo. II. Carvalho, Maria Auxiliadora Roque de. III. Mendes, Edilberto Nogueira. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE DE MÁRCIA ALMEIDA LANA

Nº REGISTRO: 9959599

Co-orientadores: Profs. Edilberto Nogueira Mendes e Maria Auxiliadora Roque de Carvalho

Relatora e Suplente: Profa. Sílvia Beleza de Moura

Às 13:00 horas do dia 29 de abril de 2005, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Eduardo Muniz Barretto Tinoco (Faculdade de Odontologia da UERJ), Carlos Roberto Martins (Faculdade de Odontologia da PUCMG), Fulgêncio Antônio dos Santos (FAFEID), Jacques Robert Nicoli (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e o Prof. Luiz de Macêdo Farias – Orientador, para julgar o trabalho final "Avaliação da ocorrência de periodontopatógenos em sítios periodontais de pacientes com e sem doença periodontal por cultura microbiológica e por reação de polimerização em cadeia", da aluna Márcia Almeida Lana, requisito final para a obtenção do Grau de **DOCTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Erna Geessien Kroon – Coordenadora do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 29 de abril de 2005.

Dr. Jacques Robert Nicoli \_\_\_\_\_

Dr. Carlos Roberto Martins \_\_\_\_\_

Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco \_\_\_\_\_

Dr. Fulgêncio Antônio dos Santos \_\_\_\_\_

Prof. Luiz de Macêdo Farias (Orientador) \_\_\_\_\_

Profa. Erna Geessien Kroon  
Coordenadora

CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

## COLABORAÇÃO

Profa. Paula Prazeres Magalhães - Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Jacques Robert Nicoli - Laboratório de Ecologia e Fisiologia Microbiana, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

“DE TUDO, FICARAM TRÊS COISAS:  
a certeza de que estamos sempre começando ...  
a certeza de que é preciso continuar ...  
a certeza de que seremos interrompidos antes de terminar ...

PORTANTO DEVEMOS  
fazer da interrupção um caminho novo ...  
da queda, um passo de dança ...  
do medo, uma escada ...  
do sonho, uma ponte  
da procura ... um encontro”

Fernando Sabino

Ao JOSÉ ANTÔNIO pela paciência e incentivo. Seu apoio e confiança me dão a certeza de que sempre poderei contar com você.

Aos meus pais, exemplo de dedicação e sabedoria, pelas lições de vida e pela alegria da nossa convivência. Obrigada pelo incentivo e pelo amor.

Ao LUCAS, por tornar minha vida cada dia mais feliz.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. LUIZ DE MACÊDO FARIAS, por tudo que tem me ensinado, a cada dia, e por toda a confiança e amizade. Sua dedicação, incentivo e apoio, em todos esses anos, foram essenciais para a minha formação. Serei sempre grata.

À Profa. MARIA AUXILIADORA ROQUE DE CARVALHO, querida Dodora, pela atenciosa orientação, estímulo e apoio. Obrigada pelo carinho e amizade que serão sempre muito importantes para minha formação pessoal e profissional.

Ao Prof. EDILBERTO NOGUEIRA MENDES, pela dedicação, orientação séria e criteriosa e por todas as valiosas sugestões, imprescindíveis para a realização deste trabalho. Obrigada por me receber com tanto atenção no Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas.

À Profa. PAULA PRAZERES MAGALHÃES, pela disponibilidade incansável, pela leitura tão atenta e por todas as importantes opiniões. Obrigada pela amizade e pela convivência tão agradável.

Ao Prof. JACQUES ROBERT NICOLI, pela importante participação neste trabalho e pela atenção e carinho com que sempre me recebeu no Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismos. Agradeço pela competência e apoio essenciais à minha formação.

À CLÁUDIA e ELMAR, LÉO e FERNANDA, pela alegria do nosso dia-a-dia.

Ao RENATO RIVAIL RODRIGUES BRAGA, com quem dividi alegrias e preocupações, nesta etapa da minha formação profissional. Obrigada pela amizade e pela dedicação tão importantes na condução deste trabalho.

Ao RODRIGO ESTEVÃO TEIXEIRA, pela amizade verdadeira e ajuda em todas as situações.

À MARIA EUGÊNIA ALVAREZ LEITE, que tanto contribuiu pela minha formação. Obrigada pela amizade e por todos os conselhos.

Às amigas SIMONE GONÇALVES DOS SANTOS e KELLY MOREIRA GRILLO, pela amizade e apoio tão importantes.

Ao amigo FRANCISCO EUGÊNIO MASSARA, pela convivência e participação tão importantes no início deste trabalho.

A Profa. REGINA NARDI DRUMOND, pela generosidade, atenção e inestimável colaboração.



Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, CLÁUDIO, VÂNIA, RENATINHA, CRISTINA, LUCINHA, CLAUDINHA, GIZELE, KÊNIA, CAROL, GLAUCIANE, LUCIANA, BRENDA, JULIANA, LUANA, NATÁLIA, SIMONE, PATRÍCIA, LETÍCIA, RENATA e CAROLINA pela convivência que torna nossos dias no laboratório sempre tão alegres.

Aos estudantes do Laboratório de Diagnóstico Genético de Doenças Infecciosas e do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microrganismo pela convivência e apoio.

Ao SÉRGIO e à LUZIA, pela amizade e ajuda eficiente, essenciais para a realização deste trabalho.

À GORETI, pela paciência, disponibilidade e simpatia.

Aos Professores da Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da PUC-MG, ELIZETE DOS REIS BORGES e PATRÍCIA SOARES RIBAS e pela atenção e apoio importantes para a seleção dos pacientes.

À Coordenação da Faculdade de Odontologia da PUC-Minas, em nome da Profa. FRANCA ARENARE JEUNON, por permitir a seleção dos pacientes e colheita dos espécimes clínicos.

Aos Professores do Programa de Pós-graduação em Microbiologia, que tanto contribuíram para a minha formação.

À todos os colegas e amigos do Curso de Pós-graduação, pela agradável convivência.

À MARIA CRISTINA DE ALMEIDA PRADO, secretária da Pós-graduação, pela maneira atenciosa e eficiente em atender todas as nossas solicitações.

À Fundação Ezequiel Dias, em nome do Prof. LUIZ SIMEÃO DO CARMO, JAMAIRA e DEISE e ao Laboratório Micra Biotecnologia, em nome do Dr. JOSÉ CARLOS SERUFO, pela contribuição na identificação dos microrganismos.

Aos pacientes, que tanto colaboraram, meu respeito, consideração e gratidão.

Ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia do ICB/UFMG, na pessoa da Prof. ERNA GEESIEN KROON, pela oportunidade.

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), ao CONSELHO NACIONAL DE AMPARO À PESQUISA (CNPq), à FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS (FAPEMIG) e à UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, pela infra-estrutura e recursos financeiros disponibilizados para a realização deste trabalho.

A Deus, pela alegria de ter tantos amigos a agradecer.

## RESUMO

Bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola* são periodontopatógenos putativos indígenas da cavidade oral, cuja freqüência e proporção nos sítios periodontais saudáveis e com doença podem exibir diferenças regionais. O objetivo deste estudo foi avaliar, por cultura microbiológica e por PCR, a ocorrência destes microrganismos em sítios periodontais de 30 pacientes com periodontite crônica, 30 com periodontite agressiva e de 30 indivíduos com periodonto saudável. Os espécimes foram colhidos com cones de papel e transferidos para Ringer PRAS, sob fluxo de CO<sub>2</sub>. O material foi homogeneizado, introduzido em câmara anaeróbica e, após realização de diluições seriadas até 10<sup>-4</sup>, cultivado em meios seletivos e incubado a 37°C por até 15 dias. A identificação bacteriana baseou-se em características morfocoloniais, morfotintoriais e bioquímico-fisiológicas. O restante do espécime clínico foi centrifugado e o sedimento empregado para extração de DNA pelo método do fenol-clorofórmio. *Primers* específicos foram utilizados para amplificação de rDNA 16S por PCR. Os resultados obtidos por cultura microbiológica mostraram associação entre *P. intermedia/nigrescens*, *F. nucleatum* e *F. varium* e periodontite crônica e entre *P. intermedia/nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans* e periodontite agressiva. Os resultados de PCR indicaram que *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Fusobacterium* spp., *T. forsythensis* e *T. denticola* estavam estatisticamente associados com as formas crônica e agressiva de periodontite, enquanto *E. corrodens* mostrou-se associada apenas à periodontite crônica. A PCR demonstrou ser mais sensível para a detecção da maioria dos microrganismos investigados. As associações, antagônicas ou sinérgicas, observadas entre as amostras bacterianas isoladas dos pacientes com periodontite agressiva diferem daquelas detectadas em pacientes com periodontite crônica, o que reforça a importância destas associações na expressão das doenças periodontais.

## SUMMARY

Black-pigmented anaerobic rods, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Tannerella forsythensis* and *Treponema denticola* are putative periodontopathogens indigenous to the oral cavity, which frequency and proportion in healthy and diseased periodontal sites may exhibit regional differences. The purpose of this study was to evaluate, by employing microbiological culture and PCR, the presence of these microorganisms in periodontal sites of 30 patients with chronic periodontitis, 30 patients with aggressive periodontitis and 30 subjects with healthy periodontium. The samples were collected with paper points and transferred to Ringer PRAS solution, under CO<sub>2</sub> flux. The material was homogenized, introduced into an anaerobic chamber and, following serial 10-fold dilutions up to 10<sup>-4</sup>, it was cultured onto selective media and incubated at 37°C for up to 15 days. Bacterial identification was based on macroscopic, microscopic and biochemical-physiological characteristics. Also, part of the clinical specimen was centrifuged and the sediment used for DNA extraction by the phenol-chloroform method. Specific primers that targeted the 16S rDNA were employed for PCR amplification. The results of the microbiological culture have shown associations between *P. intermedia/nigrescens*, *F. nucleatum*, *F. varium* and chronic periodontitis, and between *P. intermedia/nigrescens*, *A. actinomycetemcomitans* and aggressive periodontitis. The PCR results have indicated that *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Fusobacterium* spp., *T. forsythensis* and *T. denticola* were statistically associated to the chronic and the aggressive forms of periodontitis, whereas *E. corrodens* was shown to be associated only to chronic periodontitis. PCR has been shown to be more sensitive for the detection of most of the investigated microorganisms. The antagonistic or synergistic associations observed among the bacterial samples isolated from patients with aggressive periodontitis, differ from those found in patients with chronic periodontitis, which reinforces the importance of those associations in periodontal disease expression.

## LISTA DE QUADROS

1	<i>Primers</i> empregados para pesquisa de periodontopatógenos putativos por PCR e tamanho dos <i>amplicons</i> .....	59
2	<i>Primers</i> para a detecção de <i>P. gingivalis</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i> por PCR .....	61
3	Protocolos de reação empregados para detecção de <i>P. gingivalis</i> e <i>A. actinomycetemcomitans</i> por PCR .....	62
4	Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo da cultura quando comparada com a PCR, em pacientes com periodontite ou com periodonto saudável .....	74
5	Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo da PCR quando comparada com a cultura, em pacientes com periodontite ou com periodonto saudável .....	75
6	Detecção de <i>Prevotella intermedia/nigrescens</i> em espécimes subgingivais de indivíduos com e sem periodontite por cultura e PCR .....	76
7	Detecção de <i>Fusobacterium nucleatum</i> em espécimes subgingivais de indivíduos com e sem periodontite por cultura e PCR .....	76
8	Detecção de <i>Eikenella corrodens</i> em espécimes subgingivais de indivíduos com e sem periodontite por cultura e PCR .....	77

## LISTA DE GRÁFICOS

1	Níveis populacionais de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro (BPPN), <i>E. corrodens</i> e <i>F. nucleatum</i> recuperados de pacientes com periodontite crônica .....	64
2	Níveis populacionais de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro, <i>E. corrodens</i> e <i>F. nucleatum</i> recuperados de pacientes com periodontite agressiva .....	64
3	Níveis populacionais de <i>E. corrodens</i> e <i>F. nucleatum</i> recuperados de pacientes com periodonto saudável .....	64

## LISTA DE TABELAS

1	Freqüência de microrganismos isolados de espécimes subgingivais de pacientes com periodontite e de indivíduos com periodonto saudável .....	66
2	Associação entre periodontopatógenos putativos, detectados por cultura microbiológica, e <i>status</i> periodontal.....	67
3	Freqüência de detecção de microrganismos em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite e de indivíduos com periodonto saudável por PCR .....	69
4	Associação entre periodontopatógenos putativos, detectados por PCR, e <i>status</i> periodontal.....	70
5	Maior diluição na qual cada periodontopatógeno putativo foi detectado, por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite crônica.....	71
6	Maior diluição na qual cada periodontopatógeno putativo foi detectado, por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite agressiva .....	72
7	Maior diluição na qual cada periodontopatógeno putativo foi detectado, por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodonto saudável .....	73
8	Valores relativos a associações entre grupos bacterianos isolados de pacientes com periodontite crônica .....	78
9	Valores relativos a associações entre grupos bacterianos isolados de pacientes com periodontite agressiva .....	78
10	Valores relativos a associações entre grupos bacterianos, detectados por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite crônica .....	79
11	Valores relativos a associações entre grupos bacterianos, detectados por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite agressiva .....	80
12	Valores relativos a associações entre grupos bacterianos, detectados por PCR, em espécimes subgingivais de indivíduos com periodonto saudável .....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS

BANA	N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida
BA-S	<i>Brucella agar</i> suplementado com hemina (0,05mg/ml), menadiona (0,01mg/ml), extrato de levedura (5mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro
BBE	<i>Bacteroides-Bile-Esculina</i>
BPPN	Bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro
CB-S	Caldo <i>Brucella</i> suplementado com hemina (0,05mg/ml), menadiona (0,01mg/ml), extrato de levedura (5mg/ml) e L-cisteína (0,5mg/ml)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	Ácido deoxirribonucléico
dNTP	Deoxinucleotídeo
EDTA	Ácido etileno diamino tetrasódico
EYA	<i>Egg Yolk Agar</i>
GUNA	Gengivite úlcero-necrosante aguda
IC	Intervalo de confiança
KLB	<i>Kanamycin laked blood agar</i>
NC	Não calculável
ND	Não detectável
OR	<i>Odds ratio</i> (razão de chance)
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PDF	Solução de tetrametil-para-fenilenodiamina
PY	Caldo peptona-extrato de levedura
RNase A	Ribonuclease A
rDNA 16S	Gene que codifica RNA ribossômico 16S
Ringer PRAS	<i>Ringer Pre-Reduced Anaerobically Sterilized</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SIM	H <sub>2</sub> S, indol e motilidade
Tampão STET	Sacarose 8%, Tris-HCl 50 mM, EDTA 50 mM, Triton X-100 0,1%; pH 8,0
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TSA <sub>1</sub> -S	<i>Tryptic soy agar</i> suplementado com extrato de levedura (5mg/ml), L-cistina (0,75mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro

TSA <sub>2</sub> -S	<i>Tryptic Soy Agar</i> , suplementado com hemina (0,05mg/ml), menadiona (0,01mg/ml), extrato de levedura (5mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro
TSA-S	<i>Tryptic soy agar</i> suplementado com extrato de levedura (5mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro
TSB <sub>1</sub> -S	<i>Tryptic soy broth</i> suplementado com extrato de levedura (5mg/ml) e L-cisteína (0,5mg/ml)
TSB <sub>2</sub> -S	<i>Tryptic Soy Broth</i> suplementado com extrato de levedura (5mg/ml), hemina (0,05mg/ml), menadiona (0,01mg/ml) e L-cisteína (0,5mg/ml)
TSBV	<i>Tryptic soy agar serum-bacitracin-vancomycin</i>
UFC	Unidade formadora de colônia

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	15
2	REVISÃO DA LITERATURA .....	18
2.1	MICROBIOTA ORAL .....	18
2.2	DOENÇA PERIODONTAL .....	19
2.3	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DAS DOENÇAS PERIODONTAIS .....	25
2.4	MÉTODOS DE ESTUDO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS .....	35
3	OBJETIVOS .....	46
3.1	OBJETIVO GERAL .....	46
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	46
4	PACIENTES E MÉTODOS .....	47
4.1	ETAPA CLÍNICA .....	47
4.1.1	GRUPOS DE ESTUDO .....	47
4.1.2	COLHEITA DOS ESPÉCIMES CLÍNICOS .....	48
4.2	ETAPA LABORATORIAL .....	49
4.2.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....	49
4.2.2	IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICA DAS AMOSTRAS .....	51
4.2.3	MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS ISOLADAS .....	56
4.2.4	IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE PERIODONTOPATÓGENOS .....	56
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	63
4.4	ASSOCIAÇÕES ENTRE OS GRUPOS BACTERIANOS MAIS FREQUENTEMENTE DETECTADOS .....	62
5	RESULTADOS .....	63
5.1	ESTUDO MICROBIOLÓGICO .....	63
5.1.1	CULTURA .....	63
5.1.2	MÉTODO GENÉTICO .....	68
5.2	COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICO CLÁSSICO E GENÉTICO .....	73



5.3	ASSOCIAÇÃO ENTRE GRUPOS MICROBIANOS MAIS FREQUENTEMENTE RECUPERADOS .....	77
6	DISCUSSÃO .....	81
6.1	MÉTODOS EMPREGADOS .....	81
6.2	ESTUDO MICROBIOLÓGICO .....	84
6.2.1	CULTURA MICROBIOLÓGICA .....	84
6.2.2	ESTUDO GENÉTICO .....	93
6.2.3	RELAÇÃO ENTRE GRUPOS BACTERIANOS E <i>STATUS</i> PERIODONTAL .....	100
6.2.4	COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICO CLÁSSICO E GENÉTICO .....	102
6.2.5	ASSOCIAÇÕES ENTRE GRUPOS MICROBIANOS DETECTADOS COM MAIOR FREQUÊNCIA .....	108
6.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	112
7	CONCLUSÕES .....	114
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	115
9	ANEXOS .....	137
9.1	ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG .....	137
9.2	ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO .....	138
9.3	ANEXO III – FICHA CLÍNICA .....	140
9.4	ANEXO IV - CHAVES DE IDENTIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....	141
9.5	ANEXO V - TESTES ENZIMÁTICOS E BIOQUÍMICOS - SISTEMA RAPID ID 32 A .....	143

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A diversidade de organismos que compõem a microbiota indígena da cavidade oral é amplamente reconhecida. Em 2001, já haviam sido identificadas mais de 500 espécies de bactérias, especialmente no biofilme supra e subgingival. Atualmente, acredita-se que 700 espécies distintas possam colonizar os diversos sítios da cavidade oral. Esses microrganismos estão, geralmente, em equilíbrio com o hospedeiro, capaz de limitar o crescimento microbiano por respostas imunológicas efetivas. O aumento exacerbado de determinados periodontopatógenos presentes no sulco gengival leva à ruptura deste equilíbrio, podendo se instalar a doença periodontal.

As doenças periodontais afetam indivíduos de diferentes faixas etárias, níveis sócio-econômicos e regiões geográficas, apresentando variações quanto a gravidade, extensão, microrganismos envolvidos e tempo de evolução. Embora a placa bacteriana seja essencial para o estabelecimento da doença, a simples presença do microrganismo parece não ser suficiente para o seu desenvolvimento, pois fatores relacionados ao hospedeiro também exercem influência significativa na etiologia das doenças periodontais.

A manifestação destas doenças pode, ainda, ser influenciada por fatores genéticos, comportamentais e adquiridos, que comprometem, de maneira significativa, a resposta do hospedeiro contra agentes microbianos agressores, interferindo na idade em que a doença se estabelece, no grau de destruição tecidual e na resposta à terapia.

As doenças periodontais, desordens inflamatórias crônicas comuns em adultos, afetam os tecidos de suporte em resposta ao acúmulo bacteriano na superfície dental. Podem ser classificadas, dependendo dos tecidos que acometem, em gengivite ou periodontite.

As gengivites caracterizam-se por reação inflamatória somente no tecido gengival, sendo observado clinicamente alteração na cor, forma, aspecto e

posição deste tecido. Nas periodontites, há destruição do tecido periodontal, incluindo o ligamento e o osso alveolar, levando à formação de bolsa periodontal.

Hoje, sabe-se que a composição da placa associada a sítios com perda progressiva de inserção difere, consideravelmente, daquela encontrada em sítios periodontais saudáveis e que certas formas de doença periodontal são associadas a microrganismos específicos.

Entre os microrganismos que compõem a placa subgengival, algumas espécies bacterianas são, atualmente, reconhecidas como patógenos periodontais putativos. Entre elas, destacam-se: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter rectus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Tannerella forsythensis* e *Treponema denticola*, sendo *A. actinomycetemcomitans* periodontopatógeno reconhecido da periodontite agressiva e *P. gingivalis* da periodontite crônica.

Atenção especial tem sido dada à participação de certos microrganismos como marcadores de risco para o desenvolvimento das doenças periodontais. Entretanto, associações microbianas presentes nos sítios subgengivais, mais do que espécies isoladas, podem ter relação direta com saúde ou doença periodontal.

A cultura, método muito empregado no estudo de patógenos periodontais putativos, é utilizada como referência para a comparação com novas metodologias. Com este procedimento, pode-se caracterizar a microbiota periodontal, avaliar sua susceptibilidade a antimicrobianos, estudar fatores de virulência específicos, entre outros. Entretanto, a diversidade microbiana presente na bolsa periodontal pode ser subestimada quando se utiliza apenas o método de cultivo.

Recentemente, técnicas de genética molecular têm sido empregadas para o diagnóstico de doenças infecciosas e para distinção de espécies

filogeneticamente relacionadas. Entre elas, a reação de polimerização em cadeia (PCR) tem se mostrado método específico e sensível para a detecção de microrganismos, inclusive de bactérias ainda não cultiváveis presentes na placa dental.

A associação entre determinados microrganismos e doença periodontal não está, ainda, completamente esclarecida. Em relação às doenças periodontais, o processo de identificação do fator etiológico é complexo devido a certas peculiaridades observadas nestas infecções, como a presença de microbiota indígena mista, vivendo em uma comunidade altamente organizada em um biofilme dental, a característica predominantemente anaeróbia desses microrganismos, que dificulta seu cultivo e sua identificação, e a evolução episódica da doença.

Por mais de 20 anos, muitos estudos, principalmente analisando a placa dental subgingival por cultura microbiológica, têm tentado associar a presença de diferentes patógenos putativos com *status* periodontal. Estes estudos mostram que a prevalência destes patógenos pode variar entre indivíduos de diferentes regiões geográficas, pois fatores ambientais, raciais e étnicos podem interferir diretamente na distribuição dos mesmos.

Dada a escassez de dados microbiológicos nacionais sobre a relação de determinados periodontopatógenos putativos envolvidos nas gengivites e periodontites, este trabalho pretende contribuir para o esclarecimento do papel de *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus*, *Micromonas micros*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *E. corrodens*, *F. nucleatum*, *T. denticola* e *T. forsythensis* na etiopatogenia da doença periodontal, bem como a relação entre o aumento desses microrganismos e o *status* periodontal.

Este estudo está inserido na linha de pesquisa "Bacteriologia de Anaeróbios de Relevância Clínica Humana e Veterinária" em desenvolvimento no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Microbiota Oral

Bactérias habitam a cavidade oral de seres humanos e de outros animais desde o nascimento. A colonização da boca de crianças recém-nascidas depende, em parte, dos microrganismos presentes no ambiente, imediatamente após o nascimento, e de fatores do hospedeiro, incluindo a transferência passiva de imunidade materna e a resposta imune do indivíduo (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

A diversidade de organismos que compõem a microbiota oral é amplamente reconhecida; mais de 500 espécies microbianas já foram identificadas nos diversos sítios existentes na cavidade oral. Embora algumas destas espécies possam ser transitórias, muitas são residentes, observadas de forma estável no biofilme dental ou nos tecidos circunvizinhos (MOORE e MOORE, 1994). Atualmente, com o avanço e o emprego de técnicas moleculares para detecção de microrganismos, estima-se que cerca de 700 espécies podem colonizar os sítios presentes na cavidade oral (PEREA, 2004).

A complexidade da microbiota da placa dental foi constatada desde o primeiro exame ao microscópio óptico, por Leeuwenhoek, em 1683. Desde então, numerosos estudos têm avaliado a composição da placa subgingival, utilizando microscopia óptica e eletrônica, cultura e, mais recentemente, técnicas imunológicas e de genética molecular (SOCRANSKY *et al.*, 1998).

Em condições de saúde, há um equilíbrio dinâmico entre as bactérias da placa dental e o sistema de defesa do hospedeiro. Entretanto, em algumas situações, esse equilíbrio pode ser rompido por crescimento excessivo de determinado grupo microbiano ou por diminuição das defesas do hospedeiro, instalando-se a doença periodontal (DARVEAU *et al.*, 1997; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1999).

Apesar de permanecerem em regiões tão próximas ao ligamento periodontal e ao tecido conjuntivo altamente vascularizado e de

apresentarem, muitas vezes, importantes fatores de virulência, poucos destes microrganismos causam alterações em indivíduos saudáveis (DARVEAU *et al.*, 1997). Apenas algumas bactérias que compõem a placa subgengival são consideradas periodontopatógenos; sua presença, por si só, não causa dano aos tecidos, o que demonstra que os patógenos são necessários, mas não são suficientes para que a doença ocorra (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1999).

## **2.2 Doença Periodontal**

Doenças periodontais, usualmente infecções bacterianas mistas de natureza endógena, acometem o periodonto e são caracterizadas pela formação de bolsa periodontal, migração do epitélio juncional e destruição dos tecidos conjuntivo e ósseo. São amplamente distribuídas no mundo e, provavelmente, as infecções bacterianas crônicas mais comuns em adultos, evoluindo, em algumas situações, com perda do elemento dental (GRENIER e MAYRAND, 2000).

As doenças periodontais são comumente classificadas em gengivite, que afeta somente o tecido gengival, e periodontite, que acomete o tecido periodontal de suporte, incluindo o ligamento periodontal e o osso alveolar (GRENIER e MAYRAND, 2000).

A gengivite é uma reação inflamatória inespecífica da gengiva em resposta ao acúmulo de placa bacteriana próximo à margem gengival, sendo caracterizada clinicamente por vermelhidão, tumefação e tendência aumentada ao sangramento dos tecidos à sondagem. A expressão clínica da gengivite pode ser substancialmente modificada por fatores sistêmicos, como alterações do sistema endócrino e subnutrição, e medicamentos (KINANE e LINDHE, 1999).

Na periodontite, há alteração quantitativa de certas espécies bacterianas, principalmente Gram negativas, associadas à formação de bolsa

periodontal. A progressão da periodontite ocorre, usualmente, de forma episódica, com fases de atividade e inatividade de destruição tecidual, característica que reflete alterações da microbiota e da resposta imune (GRENIER e MAYRAND, 2000). Fatores do hospedeiro, como disfunção de neutrófilos e situações em que ocorre resposta imunológica deficiente, como na síndrome da imunodeficiência adquirida, no diabetes, no estresse, em algumas doenças que cursam com alterações hormonais e na presença de certos hábitos, como tabagismo, podem, também, contribuir para a destruição dos tecidos periodontais (EDWARDSSON *et al.*, 1999).

A classificação das doenças periodontais baseada no paradigma infecção/resposta do hospedeiro foi proposta, em 1989, no *World Workshop in Clinical Periodontics*, e aceita no *1<sup>st</sup> European Workshop in Periodontology*, em 1993. Cinco tipos de periodontites destrutivas foram incluídas nesta classificação: periodontite do adulto; periodontite de início precoce, que compreendia as formas pré-puberal, juvenil e de progressão rápida; periodontite associada a doenças sistêmicas; periodontite ulcerativa necrosante e periodontite refratária (RANNEY, 1993).

No *World Workshop in Clinical Periodontics*, em 1996, foi sugerida a necessidade de revisão da classificação das doenças periodontais, ainda que a classificação proposta em 1993 fosse aceita mundialmente. Esta sugestão baseava-se no fato de que as classificações anteriores apresentavam numerosas falhas, como sobreposição de categorias (periodontite associada a doenças sistêmicas e periodontite pré-puberal), inexistência de classificação para as doenças gengivais, ênfase inadequada para o fator idade como determinante do início e progressão das periodontopatias e dificuldades para se enquadrar alguns pacientes nas categorias existentes (ARMITAGE, 1999).

Assim, uma nova classificação das doenças periodontais foi proposta pela *American Academy of Periodontology* em 1999. As doenças gengivais foram incluídas nesta nova proposta e as periodontites pré-puberal, refratária e de progressão rápida foram eliminadas como entidades clínicas independentes. O critério de idade, relacionado à progressão de doença, foi abolido como

base para classificação das periodontites. Assim, as doenças periodontais foram divididas em doenças gengivais (induzidas por placa dental ou não), periodontite crônica, periodontite agressiva, periodontite como manifestação de doenças sistêmicas, doenças periodontais necrosantes, abscesso periodontal, periodontite associada a lesões endodônticas e deformidades ou condições desenvolvidas ou adquiridas (ARMITAGE, 1999).

Periodontite crônica é uma doença infecciosa que resulta na inflamação do periodonto de suporte, perda dos tecidos de inserção e reabsorção óssea, que acomete principalmente o adulto, podendo acometer, também, indivíduos jovens. A destruição tecidual é condizente com a quantidade de placa na margem gengival e cálculo está comumente presente. Geralmente, a doença progride de forma lenta, podendo apresentar surtos de atividade. A avaliação da gravidade da doença baseia-se na medida de perda de inserção e pode ser designada como leve (1-2 mm), moderada (3-4 mm) e grave (> 5 mm) (WIEBE e PUTNINS, 2000). O desenvolvimento da forma crônica de periodontite pode ser modificado por fatores locais, doenças sistêmicas e fatores extrínsecos, como o tabagismo (ARMITAGE, 1999; WIEBE e PUTNINS, 2000). Pode ser classificada como generalizada, se acomete mais de 30% dos sítios subgengivais, ou localizada, se está restrita a menos de 30% dos sítios; entretanto, as duas formas parecem apresentar a mesma etiologia e patogênese (ARMITAGE, 2004). *P. gingivalis* é uma das espécies bacterianas que parece desempenhar papel importante nesta manifestação periodontal, sendo considerada, por muitos autores, como patógeno relevante (SOCRANSKY *et al.*, 1988; HOLT *et al.*, 1999; SLOTS e TING, 1999; KAWADA *et al.*, 2004).

Periodontite agressiva é caracterizada por perda rápida de inserção e de osso alveolar e por ocorrência familiar freqüente. É uma doença infecciosa rara, freqüentemente grave, com progressão rápida, que afeta principalmente pacientes jovens. O acúmulo de depósitos microbianos não é fator essencial, porém a presença de microrganismos específicos, como *A. actinomycetemcomitans*, parece desempenhar papel importante no desenvolvimento da doença. Alterações em células fagocitárias, resposta



deficiente de anticorpos aos agentes agressores e aumento da produção de prostaglandina  $E_2$  e interleucina  $1\beta$  podem também ser observados (ARMITAGE, 1999; WIEBE e PUTNINS, 2000).

Manifestações em sítios específicos, como molares e incisivos, caracterizam a periodontite agressiva localizada, enquanto o acometimento generalizado ocorre quando há perda de inserção interproximal em pelo menos três dentes permanentes, além dos primeiros molares e incisivos (TONETTI e MOMBELLI, 1999).

Parecem existir discrepâncias significativas na incidência de periodontite em populações jovens, adultas e idosas de diferentes regiões geográficas. Indivíduos africanos apresentam maior prevalência de periodontite, seguidos pelos hispânicos e asiáticos. A relação entre *status* periodontal e características sócio-econômicas também pode ser observada, sendo a doença mais grave em populações mais pobres, sem acesso a tratamento periodontal adequado. A susceptibilidade à doença periodontal nestas populações parece, ainda, ser agravada pela presença de fatores de risco biológicos que aumentam a predisposição à doença (ALBANDAR e RAMS, 2002).

Pesquisas têm demonstrado que as doenças periodontais são prevalentes na população adulta nos Estados Unidos. Cerca de 35% dos indivíduos adultos dentados, acima de 30 anos, apresenta periodontite crônica, sendo 3,1% deles portadores de doença de grau avançado, 9,5% de grau moderado e 21,8% de grau leve (ALBANDAR, 2002). Os achados de Locker *et al.* (1998) sugerem que, no Canadá, haja diferenças na prevalência e na gravidade das doenças periodontais em certas subpopulações, como imigrantes recentes e de baixo nível sócio-econômico. Exames clínicos realizados na população canadense adulta com idade entre 35 e 44 anos mostraram ocorrência de bolsas periodontais com profundidade maior do que 4 mm em 45,6% da população e maior do que 6 mm em 8,5% dos indivíduos estudados (ALBANDAR, 2002).

Os estudos epidemiológicos para avaliação da prevalência de doença periodontal na África mostram que indivíduos com periodonto saudável são raramente encontrados, enquanto que a ocorrência de bolsas periodontais com profundidade entre 3,5 mm e 5,5 mm é observada freqüentemente na população, atingindo taxas de até 95% do grupo estudado, dependendo da idade dos indivíduos. Os dados demonstram que a população africana apresenta condição precária de higiene oral, com grande depósito de cálculo, alta prevalência de gengivite e de bolsas periodontais rasas (BAELUM e SCHEUTZ, 2002).

Miyazaki *et al.* (1991a) relataram que bolsas periodontais mais profundas que 6 mm são raramente detectadas em pacientes adolescentes europeus e, quando presentes, afetam menos de dois dentes por sextante. Em adultos, bolsas periodontais maiores que 6 mm são encontradas em 2 a 40% da população (MIYAZAKI *et al.*, 1991b). A proporção de bolsas periodontais rasas (3,5 mm a 5,5 mm) em europeus com idade entre 35 e 44 anos, varia entre 13 e 54%; no leste europeu, a média fica próxima de 45% e, no oeste, é de cerca de 36%, dados semelhantes aos encontrados nos países desenvolvidos fora deste continente. Na Europa, a doença periodontal avançada afeta uma porcentagem relativamente pequena da população, sendo mais comum em pacientes idosos. O perfil de progressão da doença parece ser compatível com a permanência de dentição funcional por um período maior na maioria dos indivíduos (SHEIHAM e NETUVELI, 2002).

Alguns estudos sugerem que os asiáticos apresentam condições periodontais menos favoráveis que os caucasianos (BOOTH e ASHLEY, 1989; ANERUD *et al.*, 1991). Entretanto, este fato atualmente tem sido contestado (CORBERT *et al.*, 2002). Avaliando as condições periodontais de crianças descendentes de asiáticos que moravam na Suécia, Matsson *et al.* (1997) observaram que elas apresentavam grande número de sítios com placa e sangramento à sondagem, enquanto que as crianças suecas apresentavam mais evidências radiográficas de reabsorção óssea na dentição primária. Com estes dados, os autores sugeriram que o controle de placa, mais do que características étnicas, poderia explicar as diferenças na experiência de

doença periodontal. Entretanto, outros estudos relatam que a população asiática apresentaria grande incidência de doença devido à maior predisposição à colonização por patógenos periodontais (UMEDA *et al.*, 1998).

Estudos realizados no Brasil avaliaram a ocorrência de gengivite em crianças de nível sócio-econômico alto e baixo e demonstraram que a prevalência da doença foi alta nas duas populações, ressaltando a universalidade desta condição. Em relação à periodontite do adulto, os estudos epidemiológicos mostram uma taxa de ocorrência que varia de 4 a 19% dos indivíduos afetados pela forma avançada da doença (GJERMO *et al.*, 2002).

Gjermo *et al.* (1984) avaliaram a prevalência de perda óssea em adolescentes brasileiros pertencentes à classe social mais baixa. Os resultados mostraram que 28% dos indivíduos apresentavam um ou mais sítios com destruição óssea e que 2,6% deles tinham periodontite juvenil. Albandar *et al.* (1991), estudando um grupo de crianças com 13 anos de idade na cidade de São Paulo, diagnosticaram doença periodontal em 1,3% dos indivíduos. Tinoco *et al.* (1997) avaliaram a prevalência de periodontite juvenil localizada em indivíduos de Belo Horizonte, Rio de Janeiro e Votorantim. Os autores observaram que esta forma da doença estava presente em 0,3% da população estudada e que a taxa de variação entre as cidades era de 0,1 a 1,1%.

Diversos fatores dificultam a comparação de resultados de diferentes estudos epidemiológicos das doenças periodontais. Entre eles, podem ser citados a falta de uniformidade no que se refere à classificação da doença, aos critérios para o diagnóstico da doença, à utilização de diferentes métodos de análise e à representatividade da amostra estudada (ALBANDAR e TINOCO, 2002).

### **2.3 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS DAS DOENÇAS PERIODONTAIS**

Os microrganismos presentes na cavidade oral desempenham papel primário na iniciação e na progressão das diferentes formas de doença periodontal. Devido à multiplicidade de fatores que controlam a constituição desta microbiota, a composição do biofilme periodontal é bastante heterogênea. Apesar das diferenças individuais e das interações complexas entre microrganismos e hospedeiro, tem sido demonstrada associação entre determinadas espécies microbianas e diferentes manifestações de doença periodontal (LISTGARTEN, 1992).

A maioria das doenças periodontais é causada por bactérias presentes no biofilme dental (SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1990, 1992). A natureza infecciosa destas entidades clínicas pode ser comprovada por estudos que correlacionam gengivite e periodontite com acúmulo de placa dental, que comprovam que a eliminação de certos microrganismos do biofilme pode se relacionar à melhora clínica e por investigações que demonstram a virulência dos microrganismos envolvidos na gênese da doença. Apesar da natureza infecciosa da doença periodontal ser amplamente aceita, a importância real de certas espécies bacterianas na promoção de alterações periodontais não está, ainda, bem estabelecida (ZAMBON, 1996; NISHIHARA e KOSEKI, 2004).

Muito se discute a respeito dos principais patógenos associados às diversas formas de doenças periodontais, especialmente, devido às dificuldades de isolamento, cultivo e identificação dos microrganismos possivelmente envolvidos no processo, às características próprias da doença, que evolui de forma episódica, com surtos de atividade, à presença de grande variedade de bactérias oportunistas na cavidade oral, particularmente na bolsa periodontal, e à dificuldade de se identificar o papel de uma única espécie em infecções de caráter polimicrobiano (ZAMBON, 1996).

O conceito de placa não específica, apoiado pelos estudos de gengivite experimental, proposto por Løe *et al.* (1965), sugeria que o acúmulo de

placa bacteriana, com seus produtos tóxicos, estaria associado ao surgimento da doença periodontal. Porém, essa hipótese não explicava a destruição associada à presença dos microrganismos em alguns sítios específicos e à ausência de correlação entre o acúmulo de placa e a gravidade da doença periodontal observada em alguns pacientes (LOESCHE, 1976).

Tendo por base a especificidade da placa bacteriana, com algumas modificações nos postulados de Koch, vários critérios para avaliar a associação de microrganismos específicos com a etiologia da doença periodontal têm sido propostos. Para ser reconhecido como patógeno, um microrganismo deve estar presente em grande número na lesão e sua eliminação deve estar associada à melhora clínica, deve ser detectada resposta imune específica do hospedeiro, os agentes etiológicos putativos devem apresentar fatores de virulência que se relacionem à doença e a destruição do tecido deve ser reproduzida em animais na presença do patógeno putativo (SOCRANSKY, 1977).

Com o avanço das técnicas de isolamento de microrganismos em condições de anaerobiose, pôde-se perceber que a placa dental de sítios periodontais com lesões era qualitativamente distinta daquela presente em sítios saudáveis (LOESCHE, 1976; DZINK *et al.*, 1988). Assim, enquanto a inflamação gengival está associada ao acúmulo inespecífico de placa dental bacteriana, a perda de tecido conjuntivo de inserção e de osso alveolar, característica da periodontite, está relacionada à ação de certas espécies bacterianas (SLOTS, 1979; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992; ZAMBON, 1996).

Em sua maioria, os patógenos periodontais são membros da microbiota indígena presentes em baixos níveis em sítios saudáveis, mas que aumentam em número durante o desenvolvimento da doença, comportando-se como patógenos oportunistas. Fatores de virulência identificados em alguns destes microrganismos apóiam a hipótese de que os mesmos desempenham papel na etiopatogênese das doenças periodontais. Entre eles, podem ser citados a produção de enzimas proteolíticas, que destroem colágeno, imunoglobulinas e sistema do complemento, a liberação

de leucotoxinas, que inibem a função de neutrófilos, e a endotoxina, presente na parede celular de patógenos periodontais Gram negativos, que estimula a resposta imunológica, induzindo reabsorção óssea, liberação de prostaglandinas e de outras citocinas (GENCO e LOOS, 1991).

Embora centenas de espécies colonizem a cavidade oral, apenas algumas bactérias são reconhecidas como periodontopatógenos. Entre elas, destacam-se *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* (anteriormente denominado *Wolinella recta*), *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythensis* (anteriormente denominada *Bacteroides forsythus*) e *Treponema* spp. Existem evidências de que outros grupos microbianos são importantes na etiologia das doenças periodontais, como bacilos entéricos, *E. corrodens*, leveduras, *Pseudomonas* spp., *Selenomonas* spp. e *Staphylococcus* spp. (ZAMBON, 1996).

*A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis*, segundo Chen e Slots (1999), são consideradas as principais bactérias envolvidas na periodontite.

*A. actinomycetemcomitans* é um cocobacilo Gram negativo, anaeróbio facultativo e capnófilico. É, atualmente, considerado o principal patógeno associado à periodontite que acomete pacientes jovens (SLOTS *et al.*, 1980; BAEHNI *et al.*, 1981; ZAMBON *et al.*, 1983; SLOTS e TING, 1999; GRENIER e MAYRAND, 2000). Esta espécie bacteriana tem sido relacionada ao aumento do risco de perda óssea e, devido à forte associação com periodontite juvenil localizada, tem sido aceita como marcador para monitoramento do curso da doença (TINOCO, 1998). Embora *A. actinomycetemcomitans* nem sempre seja considerado membro da microbiota indígena periodontal, vários estudos relatam a presença desta bactéria em sulcos gengivais de indivíduos sem manifestações de doença (TAICHMAN *et al.*, 1984; PREUS *et al.*, 1994; SLOTS e TING, 1999; HENDERSON *et al.*, 2003).

Diversos fatores de virulência têm sido identificados e relacionados ao potencial agressor de *A. actinomycetemcomitans*, entre eles liberação de uma leucotoxina potente capaz de alterar células do sistema imunológico (BAEHNI *et al.*, 1979), habilidade de aderir às estruturas dentais e de invadir

tecidos periodontais (SAGLIE *et al.*, 1988), presença de endotoxina, fator importante na indução de resposta imune, e outros fatores, como produção de substâncias tipo bacteriocina, de inibidores da quimiotaxia para neutrófilos, de fatores imunossupressores e citotóxicos, de inibidores de fibroblastos e de colagenase (STEVENS *et al.*, 1987; WILSON e HENDERSON, 1995; ZAMBON *et al.*, 1996).

Embora *A. actinomycetemcomitans* possa induzir resposta imune local e sistêmica, alguns estudos têm demonstrado que outras bactérias, como *P. gingivalis* e *P. intermedia*, também podem ser responsáveis por resposta semelhante em pacientes com periodontite juvenil localizada (TOLO e SCHENCK, 1985).

Também existem evidências da relevância de certas espécies de bactérias produtoras de pigmento negro na patogênese da periodontite que acomete indivíduos adultos. Este grupo microbiano, que compreende espécies dos gêneros *Porphyromonas* e *Prevotella*, é constituído por cocobacilos Gram negativos anaeróbios obrigatórios geralmente associados a infecções orais (FINEGOLD *et al.*, 1993; ZAMBON, 1996).

*P. gingivalis* é pouco freqüente ou é recuperada em números muito baixos de indivíduos adultos com tecido periodontal sem alteração, mas ocorre em 40 a 100% dos pacientes adultos com periodontite. Representa uma proporção considerável da microbiota subgingival de bolsas periodontais profundas e, associada a outros microrganismos com potencial patogênico, é considerada patógeno importante na gênese da periodontite que acomete indivíduos adultos (HOLT *et al.*, 1999). Libera uma série de proteínas e produtos do metabolismo que atuam, diretamente, em células do hospedeiro, possibilitando, assim, evadir das defesas imunológicas. A cápsula exibida pelo microrganismo tem sido considerada fator de virulência importante. Esta espécie pode também desempenhar papel relevante na formação e manutenção do biofilme periodontal pela interação com outras espécies bacterianas, como *Actinomyces viscosus*. Outra característica de *P. gingivalis* é a capacidade de invadir o tecido conjuntivo, habilidade relacionada à produção de proteases, entre elas colagenases e outras

toxinas, que promovem a destruição tecidual (SANDROS *et al.*, 1994; HOLT *et al.*, 1999).

As espécies produtoras de pigmento negro do gênero *Prevotella* são isoladas da cavidade oral de indivíduos sem alterações periodontais. *P. intermedia* é uma espécie bacteriana freqüentemente associada ao desenvolvimento de doenças periodontais, como gengivite úlcero necrosante aguda (GUNA), periodontite do adulto (JOUSIMIES-SOMER, 1995), gengivite gravídica e lesões periodontais associadas à infecção por HIV (MAEDA *et al.*, 1998).

Tem sido sugerido que *P. intermedia* apresenta heterogeneidade bioquímica, sorológica e genética. Em decorrência disto, Shah e Gharbia (1992) sugeriram que a espécie fosse reclassificada em *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Com base nesta mudança taxonômica, alguns investigadores avaliaram a incidência destas espécies em sítios periodontais saudáveis e com doença. Gharbia *et al.* (1994) relataram que *P. intermedia* está relacionada à doença periodontal e *P. nigrescens* é isolada, mais freqüentemente, de sítios gengivais saudáveis e de pacientes com infecções endodônticas. Teanpaisan *et al.* (1995) estimaram que tanto *P. intermedia* como *P. nigrescens* poderiam ser encontradas em sítios doentes ou saudáveis. Em contraste, Mättö *et al.* (1996) sugeriram que *P. intermedia* poderia estar associada à doença periodontal, pois, em seus estudos, esta espécie não foi recuperada de periodonto saudável.

Vários fatores de virulência produzidos pelo gênero *Prevotella*, especialmente *P. intermedia/nigrescens* têm sido demonstrados, encontrando-se associados à colonização, invasão e destruição tecidual. Componentes da superfície celular poderiam relacionar-se à destruição do tecido periodontal ou à aderência a células epiteliais. Proteases também já foram sugeridas como possíveis fatores patogênicos do grupo bacteriano (SHIBATA *et al.*, 1993).

*E. corrodens* é uma bactéria Gram negativa anaeróbia facultativa freqüentemente isolada da cavidade oral de seres humanos. Apresenta



vários fatores de virulência como endotoxina, proteínas de membrana externa, adesinas e camada exopolissacarídica que impede a ação fagocitária por células do sistema imune. Tem sido sugerida como patógeno na periodontite do adulto e pode estar associada à periodontite juvenil. Também é encontrada na placa subgengival de indivíduos sem manifestações de doença periodontal (CHEN e WILSON, 1992). Savitt e Socransky (1984) observaram que *E. corrodens* estava presente em, aproximadamente, 10% dos espécimes de placa subgengival de sítios sem sinais de doença. Esses dados foram confirmados por Chen e Wilson (1992), que consideraram o microrganismo membro da microbiota oral indígena, sendo sua ocorrência na placa subgengival compatível com periodonto saudável. De acordo com os autores, a bactéria pode desempenhar papel importante em certas formas clínicas de periodontite. Estudos desenvolvidos por Tanner *et al.* (1979) mostraram, entretanto, evidências limitadas de associação entre *E. corrodens* e doença periodontal.

*Fusobacterium* é um gênero constituído por bacilos Gram negativos pleomórficos anaeróbios obrigatórios. São isolados, freqüentemente, do sulco gengival de seres humanos (HOLT *et al.*, 1994). Uma das espécies mais importantes do gênero, *F. nucleatum*, tem sido correlacionada à doença periodontal (SLOTS e RAMS, 1990; HAFFAJEE e SOCRANSKY, 1994). Esta espécie bacteriana é capaz de causar dano aos tecidos periodontais e induzir resposta imunológica específica (SCHENKEIN *et al.*, 1993). Possui endotoxina como fator de virulência, que estimula resposta inflamatória, além de atuar diretamente no processo destrutivo do periodonto (KAUR e FALKER, 1992). Loesche (1992) relatou que a virulência de *F. nucleatum* também está relacionada à capacidade de produção de enzimas como DNase e proteases. Embora *F. nucleatum* seja potencialmente patogênico, seu papel na etiopatogenia das doenças periodontais ainda é discutível (LOESCHE, 1992; SHELBURNE *et al.*, 1993). Segundo Haffajee e Socransky (1994), a associação do microrganismo com outras espécies bacterianas, como *T. forsythensis* e *P. gingivalis*, é fator determinante na transição entre saúde e doença. De acordo com os autores, *F. nucleatum* é um patógeno

putativo, podendo estar envolvido na alteração dos níveis de inserção epitelial na lesão periodontal.

Espiroquetas, microrganismos Gram negativos, anaeróbios, móveis e helicoidais, estão presentes em bolsas periodontais. Vários estudos têm demonstrado que algumas espécies que fazem parte da microbiota oral, como *T. denticola*, são importantes na patogênese de uma variedade de doenças orais como as gengivites, incluindo a gengivite úlcero-necrosante e todas as formas de periodontite (MOORE *et al.*, 1985; MOORE *et al.*, 1991; RIVIERE *et al.*, 1995; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1999). Devido à capacidade de invadir os tecidos conjuntivo e epitelial intactos, Dewhirst *et al.* (2000) sugeriram que espiroquetas poderiam desempenhar papel importante nas doenças infecciosas da cavidade oral. Simonson *et al.* (1988) observaram que o número de espiroquetas na placa subgengival, especialmente *T. denticola*, aumenta com o agravamento da doença periodontal. Por esta razão, os autores relacionaram a espécie bacteriana com as formas agressivas da doença. Mombelli *et al.* (1994) sugeriram que esta espiroqueta também está envolvida em quadros clínicos que não respondem bem ao tratamento periodontal. Embora vários morfotipos de espiroquetas possam ser observados em microscopia de campo escuro, a maioria destes microrganismos não é cultivável. Entre as espécies orais cultiváveis de *Treponema*, *T. denticola* tem sido freqüentemente associada à periodontite crônica. Entretanto, acredita-se que uma grande diversidade de espiroquetas pode estar presente na placa subgengival e desempenhar papel importante na patogênese das doenças periodontais (DEWHIRST *et al.*, 2000). Moter *et al.* (1998) relataram que, para se reconhecer o papel etiológico dos treponemas orais, métodos, especialmente genéticos, deveriam ser empregados para detecção dos organismos, tanto daqueles cultiváveis como daqueles que ainda não foram isolados em meios de cultura artificiais.

*T. forsythensis* é um bastonete Gram negativo anaeróbio obrigatório, de isolamento difícil, muito freqüente em bolsas periodontais (YANO-HIGUCHI *et al.*, 2000). Foi descrito por Tanner *et al.* (1979), que propuseram a

denominação *B. forsythus*. Em 1994, Paster *et al.*, analisando a o gene que codifica o RNA ribossômico 16S (rDNA 16S) do microrganismo, sugeriram que a espécie não deveria ser incluída no gênero *Bacteroides*. Em 2002, Sakamoto *et al.* propuseram a reclassificação do microrganismo como *T. forsythensis*. Como *P. gingivalis* e *T. denticola*, *T. forsythensis* produz enzimas, como tripsina, que podem ser importantes na patogênese das doenças periodontais (ISHIHARA *et al.*, 1992). Segundo Alpagot *et al.* (1996) e Machtei *et al.* (1997), a progressão da doença periodontal em adultos pode estar associada a níveis elevados de *P. gingivalis* e *T. forsythensis*, espécies consideradas indicadores de risco de desenvolvimento da doença e associadas a quadros clínicos que não respondem bem ao tratamento periodontal. De acordo com Socransky *et al.* (1998), *T. forsythensis* está associada a bolsas periodontais com profundidade intermediária e a sítios com lesão inicial.

Contrariando dados disponíveis na literatura, Conrads *et al.* (1996), empregando PCR, não detectaram a presença de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em sítios saudáveis, concluindo, assim, que esses patógenos periodontais podem não ser componentes da microbiota indígena.

Entretanto, para Riviere *et al.* (1996), a colonização de sulcos gengivais por patógenos periodontais putativos Gram negativos não se relaciona exclusivamente à presença de inflamação gengival. Segundo Ximénez-Fyvie *et al.* (2000), em amostras de placa supra e subgengival de indivíduos com periodonto saudável, microrganismos patogênicos como *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *C. rectus* e *P. intermedia* podem estar presentes, embora em proporções menores que em bolsas periodontais.

Murro *et al.* (1997) observaram ocorrência freqüente de patógenos periodontais, como *P. gingivalis*, em sítios saudáveis. Entretanto, os autores relataram que linhagens pertencentes à espécie bacteriana apresentavam fatores de virulência diferentes, possibilitando sua permanência naqueles indivíduos sem induzir manifestações clínicas de doença.

Tanner e Bouldin (1989) analisaram a microbiota predominante em sítios inativos e em lesões periodontais iniciais em adultos. Segundo os autores, as espécies predominantes isoladas de sítios ativos incluíam *T. forsythensis* e *C. rectus*. Tanner *et al.* (1998) e Haffajee *et al.* (1998) encontraram número elevado de *Selenomonas noxia*, *T. forsythensis* e *C. rectus* em sítios com periodontite, sugerindo o papel iniciador dessas espécies bacterianas nas lesões periodontais.

Fatores raciais e ambientais podem influenciar a alta prevalência de *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola*. Apesar das investigações atuais indicarem forte associação entre estas bactérias e a forma crônica de periodontite, os dados apresentados não podem ser considerados como indicadores de que estas espécies são as únicas envolvidas na etiopatogênese desta forma de doença periodontal. Indivíduos com periodontite do adulto podem apresentar ausência ou número muito baixo destas espécies ou, ainda, outros microrganismos fortemente associados ao dano tecidual (SLOTS *et al.*, 1990).

Atenção especial tem sido dada à participação possível de certas espécies bacterianas como marcadores de risco para as doenças periodontais destrutivas. Entretanto, associações microbianas podem estar presentes nos sítios subgingivais, propiciando um espectro de relações com o hospedeiro que variam de nocivas a benéficas. Segundo Socransky *et al.* (1998), a presença de dois periodontopatógenos em um mesmo sítio pode não ter efeito nocivo, pois o potencial de patogenicidade dos mesmos pode estar diminuído nesta associação. Por outro lado, a habilidade de produzir doença pode ser acentuada, dependendo das interações entre os microrganismos. De acordo com os autores, é possível que complexos microbianos representem infecções mistas clássicas. Por exemplo, *F. nucleatum* proporciona crescimento ideal de *T. forsythensis* e a possível combinação com *C. rectus* pode ser necessária para induzir a doença. Outra possibilidade é que estes complexos representem combinações de espécies que são individualmente patogênicas, porém, em conjunto, tenham sua

patogenicidade aumentada, representando risco adicional para os tecidos periodontais.

Associação positiva entre *A. actinomycetemcomitans* e *T. forsythensis* foi observada por Ashimoto *et al.* (1996), numa avaliação que envolveu 150 pacientes com diagnóstico de gengivite e de periodontite avançada. Estes autores afirmaram que associação positiva entre microrganismos pode indicar a existência de simbiose na bolsa periodontal. Um patógeno pode colonizar mais rapidamente sítios subgengivais já ocupados por outras bactérias devido à inflamação do tecido ou a fatores de crescimento produzidos por outros microrganismos. Porém, os autores ponderaram que algumas bactérias podem ser detectadas simultaneamente em lesões periodontais apenas porque ambas induzem destruição periodontal, sem que haja interação direta entre elas.

Rams *et al.* (1997) avaliaram 1255 pacientes adultos com periodontite avançada, com idade variando de 23 a 96 anos. O objetivo do estudo foi investigar a presença de associações microbianas, positivas ou negativas, em sítios com doença periodontal. *P. intermedia/nigrescens* e *Fusobacterium sp.*, *T. forsythensis* e *Fusobacterium sp.* e *Micromonas micros* (anteriormente *Peptostreptococcus micros*) e *Mitsuokella dentalis* apresentaram associação fortemente positiva em bolsas periodontais profundas. Foi observada associação negativa entre *A. actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium sp.*; os autores concluíram que *Fusobacterium* está associado com o desenvolvimento de inflamação gengival e, quando emerge como membro predominante da microbiota subgengival, pode apresentar habilidade de inibir *A. actinomycetemcomitans*.

Socransky *et al.* (1998) descreveram a presença de cinco complexos microbianos na placa subgengival de 185 indivíduos adultos. Um dos complexos, denominado complexo vermelho, composto pelas espécies *T. forsythensis*, *P. gingivalis* e *T. denticola*, estava fortemente associado ao aumento de profundidade da bolsa e ao sangramento à sondagem. Outro complexo, o laranja, constituído por espécies dos gêneros *Fusobacterium*,

*Prevotella*, *Campylobacter*, *Streptococcus* e *Eubacterium*, parece preceder a colonização pelo complexo vermelho e, conseqüentemente, tem papel importante na patogênese da infecção periodontal. A maior parte das espécies do grupo laranja é considerada patógeno periodontal putativo. Os outros três complexos, o amarelo, o verde e o roxo, exibem forte associação entre si e associação fraca com os outros dois complexos e são compostos, em sua maioria, por espécies consideradas benéficas como as dos gêneros *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Capnocytophaga*.

Existem muitas evidências de que as propriedades bioquímico-fisiológicas e a patogenicidade da microbiota oral são amplamente influenciadas pelo meio ambiente. Porém, a análise da interação entre microrganismo e ambiente é dificultada pelo fato de que as doenças periodontais são infecções mistas, de caráter sinérgico, ocorrendo em um sistema dinâmico, onde as barreiras do hospedeiro e as relações interbacterianas são de importância fundamental (CUTLER *et al.*, 1995; GRENIER e MAYRAND, 1995, 2000).

A avaliação microbiológica da placa subgingival de indivíduos com tecidos periodontais saudáveis ou com diferentes alterações tem proporcionado a indicação de espécies cuja presença, muitas vezes, é compatível com a estabilidade dos níveis de inserção; por outro lado, reforça também o papel de certas espécies na patogênese da doença periodontal. Além disso, estudos que visam avaliar a composição da microbiota supra e subgingival de indivíduos saudáveis podem auxiliar na prevenção e no tratamento dos indivíduos com infecções periodontais (HAFFAJEE *et al.*, 1998).

## **2.4 MÉTODOS DE ESTUDO DE PATÓGENOS PERIODONTAIS**

Como mencionado, vários estudos têm revelado a existência de forte associação entre microrganismos específicos que colonizam sítios subgingivais em diferentes condições clínicas. Entretanto, a interpretação

desses dados deve ser realizada com cautela, pois um microrganismo envolvido em processo de agudização ou em doença estabelecida pode ser o colonizador secundário e não o microrganismo responsável pelo início do dano tecidual. Assim, o aprimoramento das técnicas de isolamento e identificação de microrganismos pode revelar espécies bacterianas fortemente associadas às doenças periodontais, como as espiroquetas, cujo isolamento é extremamente difícil, um dos motivos pelos quais seu papel na doença ainda não está bem estabelecido (GENCO e LOOS, 1991).

As dificuldades observadas na procura de agentes etiológicos de doença periodontal incluem problemas técnicos, tais como a obtenção da amostra microbiana adequada, bem como o cultivo e a identificação destes microrganismos. Outro problema é a falta de conceitos claros relativos às doenças periodontais, como a natureza destas infecções, a dificuldade de se determinar o estado de atividade das lesões e a possibilidade de múltiplas manifestações periodontais em um mesmo indivíduo (SOCRANSKY *et al.*, 1987; SOCRANSKY e HAFFAJEE, 1992).

A cultura tem sido muito empregada no estudo de patógenos periodontais putativos e é utilizada como referência para a comparação com outros métodos de detecção. Este procedimento, apesar de suas limitações, é fundamental para caracterização da microbiota periodontal, avaliação da susceptibilidade a antimicrobianos, análise quantitativa dos principais microrganismos viáveis no espécime (GENCO e LOOS, 1991) e, ainda, para o conhecimento das interações microbianas presentes nas doenças periodontais (MANDELL, 1984; SOCRANSKY *et al.*, 1999).

Socransky *et al.* (1987) descreveram os problemas principais encontrados no estudo dos agentes etiológicos da doença periodontal. Destacaram as dificuldades técnicas, como obtenção da amostra microbiana (representatividade da amostra colhida, impossibilidade de colheitas do mesmo sítio para confirmação de dados, método de colheita e meios de cultivo), dispersão da amostra, condições de cultivo (meios e presença de microrganismos fastidiosos e não cultiváveis) e dificuldades para caracterização e identificação dos isolados. Os autores relataram também

problemas relacionados à complexidade e ao caráter oportunista da microbiota e à característica própria da doença periodontal, com surtos de atividade e quiescência. Consideraram também que o desenvolvimento de novas metodologias, como sorologia e hibridização, tornaria possível a identificação de espécies ainda não cultivadas ou de caracterização difícil, que poderiam exercer papel fundamental no desenvolvimento da doença periodontal.

O estudo dos microrganismos associados à doença periodontal muitas vezes se faz de maneira imprecisa, pela dificuldade de se analisar o espécime clínico obtido, especialmente pela diversidade de colonização da superfície dental e dos tecidos circunvizinhos. O número de sítios que precisam ser avaliados para se detectar o microrganismo alvo depende de cada espécie (CHEN e SLOTS, 1999). Mombelli *et al.* (1991) relataram que o espécime subgingival ideal para a detecção de *P. gingivalis* deve ser obtido pela colheita de placa subgingival de, pelo menos, quatro sítios distintos. Christersson *et al.* (1992) também demonstraram que a colheita a partir de três bolsas periodontais com profundidade acima de 5 mm leva à probabilidade de recuperação de *P. gingivalis* de 95% dos casos, enquanto que, para recuperação de *A. actinomycetemcomitans*, amostragem de número muito maior de sítios seria necessária.

Rams *et al.* (1996) avaliaram a ocorrência de cinco periodontopatógenos putativos na bolsa periodontal de pacientes com periodontite recorrente, 12 meses após o tratamento periodontal. Observaram que a cultura foi um método bastante eficiente, permitindo a recuperação de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *C. rectus* e *M. micros*.

Tinoco *et al.* (1997) utilizaram cultura para investigar a associação de *A. actinomycetemcomitans* com periodontite juvenil localizada em brasileiros. Os autores analisaram, também, placas bacterianas subgingivais dos familiares dos pacientes. Os resultados mostraram que o método permitiu detectar *A. actinomycetemcomitans* em 80% dos pacientes e em 39,5% dos familiares.



A presença de patógenos periodontais considerados marcadores microbiológicos de atividade da doença periodontal foi avaliada por Eley e Cox (1998). Os autores concluíram que a cultura permitiu recuperar tais microrganismos, desde que fossem utilizadas técnicas adequadas, como meio de cultura enriquecido. Enfatizaram que, obtida a cultura pura, outros métodos laboratoriais podem ser empregados, entre eles testes bioquímicos, hibridização, ribotipagem e avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos. No entanto, nem todas as bactérias possivelmente envolvidas podem ser facilmente cultivadas e a proporção de espécies cultiváveis pode não representar aquela existente na bolsa periodontal. Por outro lado, Ashimoto *et al.* (1996) relataram que a cultura é um procedimento dispendioso e passível de falhas.

O desenvolvimento de meios de cultura seletivos para recuperação de um dado patógeno é, primariamente, baseado na presença de nutrientes essenciais e na propriedade de inibir ou reduzir a multiplicação de microrganismos contaminantes. Entretanto, podem ocorrer falhas por seletividade excessiva ou insuficiente (ALSINA *et al.*, 2001).

Segundo Chen e Slots (1999), a avaliação microbiológica da placa bacteriana subgengival em meios não seletivos acarreta maior limitação na detecção de microrganismos viáveis no espécime clínico. Com a adição de antimicrobianos ao meio de cultivo, pode-se suprimir a proliferação de determinadas espécies bacterianas que, *in vitro*, seriam capazes de inibir o crescimento do microrganismo alvo. Entretanto, alguns microrganismos, como *P. gingivalis*, não podem ser recuperados em meios contendo antimicrobianos já que os meios seletivos disponíveis para seu isolamento muitas vezes inibem sua multiplicação.

Em síntese, a identificação de patógenos periodontais específicos por métodos convencionais, com cultivo em anaerobiose, segundo Watanabe e Frommel (1993) e Garcia *et al.* (1998), é difícil, demorada e, algumas vezes, não reproduz a condição microbiológica periodontal.

Vários sistemas de identificação de bactérias anaeróbias encontram-se disponíveis sob a forma de *kit* e sua capacidade de discriminar amostras bacterianas tem sido avaliada por diversos pesquisadores (APPELBAUM *et al.*, 1983; KARACHEWSKI *et al.*, 1985; HEAD e RATNAM, 1988). Rapid ID 32 A (anteriormente denominado ATB 32 A) é um sistema de identificação para anaeróbios, fabricado pela bioMérieux (Marcy l'Etoile, França), que utiliza testes enzimáticos dispostos em 29 poços, cuja leitura pode ser feita visualmente (ARZESE *et al.*, 1994) ou de forma automatizada, empregando-se sistemas computadorizados que comparam os resultados obtidos com aqueles existentes em base de dados específica (ATB system). O sistema permite a detecção da atividade enzimática da amostra após 4 horas, sem necessidade de incubação em condições de anaerobiose, uma vez que multiplicação bacteriana não é necessária (MURRAY *et al.*, 1985).

De acordo com Kitch e Appelbaum (1989), quando associado a testes convencionais, como avaliação de características macroscópicas e microscópicas, produção de catalase e teste respiratório, o sistema mostrou-se eficiente para identificação de 97% das amostras de *Bacteroides* do grupo *B. fragilis*, de 88% das amostras de *Bacteroides* spp. e de 50% daquelas de *Fusobacterium* spp. Para os autores, o sistema ATB 32 A representa um avanço para a identificação de bactérias anaeróbias de importância clínica.

Looney *et al.* (1990), avaliando o mesmo sistema de identificação, observaram que todas as amostras de referência e a maioria dos isolados clínicos dos gêneros *Bacteroides* e *Fusobacterium* (90,6% e 95,5%, respectivamente) foram corretamente identificados no nível de espécie. O sistema não foi capaz de identificar cerca de 3,0% das amostras e identificou incorretamente 2,0% das mesmas. Os autores relataram a necessidade de testes adicionais para identificar, de forma precisa, algumas amostras. Entretanto, o emprego de métodos mais complexos e dispendiosos, como cromatografia gás-líquido, não é requerido.

Roger *et al.* (1991) avaliaram a eficiência do ATB 32 A para identificação de bactérias isoladas de espécimes clínicos e amostras de referência e

observaram que o sistema permitiu a identificação de 89,5% das amostras. Deste percentual, houve necessidade da realização de testes adicionais para identificação definitiva de 6,4% das amostras. Com este método, não foram identificadas 5,6% das amostras e 4,9% delas foram identificadas incorretamente.

A eficiência do sistema ATB 32 A para identificação de *Bacteroides* do grupo *B. fragilis* também foi avaliada por Jenkins *et al.* (1991). O sistema permitiu identificar 78,4% das amostras no nível de espécie e, acrescido de testes complementares, possibilitou a identificação de 94,6% dos microrganismos estudados.

Arzese *et al.* (1994), comparando a identificação de bactérias anaeróbias pelo ATB system, por testes bioquímicos convencionais e por cromatografia gasosa, observaram que o sistema Rapid ID 32 A, com leitura automatizada, permitiu a identificação de 90,7% das amostras bacterianas, especialmente das Gram negativas. Cerca de 6% e de 4% dos isolados foram incorretamente identificados ou não identificados, respectivamente. Para identificação das amostras do gênero *Fusobacterium*, no nível de espécie, testes adicionais foram necessários.

Downes *et al.* (1999) observaram que o kit Rapid ID 32 A mostrou-se eficiente para a identificação de, aproximadamente, 61% das amostras de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro. Associando-se testes complementares recomendados pelo sistema, mais 21% das amostras foram identificadas corretamente, no nível de espécie. A identificação de 13% das amostras foi possível apenas no nível de gênero e 5% delas foram identificadas, de maneira imprecisa, no nível de espécie. Foi observado baixo poder de discriminação entre *F. nucleatum* e *Fusobacterium necrophorum*, *Porphyromonas asaccharolytica* e *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella buccalis*, *Prevotella denticola*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella melaninogenica* e *Prevotella oralis*.

Em resumo, os sistemas baseados em reações enzimáticas, como o Rapid ID 32 A, são uma alternativa útil para a identificação de bactérias

anaeróbias, especialmente em laboratórios de diagnóstico clínico (LOONEY *et al.*, 1990), que permite a identificação rápida, inclusive, de bactérias anaeróbias mais fastidiosas (ROGER *et al.*, 1991).

Nos últimos anos, técnicas de genética molecular têm sido empregadas para o diagnóstico de doenças infecciosas e para a distinção de espécies filogeneticamente relacionadas (RIGGIO e LENNON, 1997).

Entre as novas tecnologias aplicadas ao diagnóstico microbiológico das doenças periodontais, técnicas baseadas no emprego de sondas de DNA oferecem especificidade e sensibilidade equivalentes aos métodos de cultura para detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* em amostras de placa subgengival de seres humanos (LÓPEZ, 2000). Listgarten *et al.* (1995) compararam a eficiência da cultura, da imunofluorescência indireta e da hibridização para detecção de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* em bolsas periodontais. Segundo os autores, a técnica de imunofluorescência indireta mostrou-se mais eficiente, sendo a cultura e a hibridização métodos pouco sensíveis para a detecção destes microrganismos. Van Steenberg *et al.* (1996) compararam a sensibilidade da hibridização DNA-DNA com a cultura para detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* e observaram que a hibridização foi a técnica mais sensível, provavelmente, devido à presença de bactérias não viáveis nas amostras avaliadas. Assim, a impossibilidade de distinguir células viáveis poderia ser um fator limitante dos métodos genéticos e a impossibilidade de detecção de células não viáveis um fator limitante do método microbiológico tradicional.

Utilizando hibridização DNA-DNA em amostras obtidas de adultos com periodontite, López (2000) observou a ocorrência de *P. gingivalis* em 75,0% dos sítios ativos e em 59,7% dos sítios inativos avaliados. *A. actinomycetemcomitans* foi detectado em 6,3% e em 12,5% dos sítios ativos e inativos, respectivamente, enquanto *P. intermedia* foi encontrada em 33,0% dos pacientes, tendo sido detectada em alta proporção nos sítios periodontais em atividade. Segundo o autor, a hibridização é uma técnica que pode ser amplamente utilizada para detectar e quantificar

microrganismos. Entretanto, existem alguns questionamentos em relação à sua sensibilidade para a pesquisa de periodontopatógenos, especialmente devido à baixa detecção de *A. actinomycetemcomitans* observada.

PCR é um método específico e altamente sensível para identificação de microrganismos. Entre as diversas seqüências que podem ser empregadas como alvo para amplificação, o gene rDNA 16S é um dos mais utilizados. O gene está presente em todas as eubactérias e é altamente conservado na mesma espécie. Por estas razões, a técnica é muito útil para a detecção de bactérias, podendo ser utilizada, inclusive, para aquelas que não são, ainda, cultiváveis (Ashimoto et al., 1996).

Slots et al. (1995) compararam PCR, empregando *primers* para a detecção de rDNA 16S, com cultura para pesquisa de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola*. Observaram que PCR apresentava sensibilidade elevada e era reprodutível, podendo ser útil na pesquisa dos patógenos periodontais.

PCR desenvolvida para a detecção de rDNA 16S, cultura e hibridização foram utilizadas, por Ashimoto et al. (1996), para investigar a prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* e *T. denticola* em espécimes subgingivais de 50 pacientes com periodontite avançada e de 50 adultos e 50 crianças com gengivite. O estudo mostrou que a prevalência destes microrganismos foi maior nos pacientes com periodontite, com exceção de *C. rectus* que era mais freqüente nas crianças com gengivite. Os autores demonstraram, também, que PCR é um método de detecção muito útil e sensível para a identificação destes periodontopatógenos.

No estudo de Riggio et al. (1996), a presença de periodontopatógenos foi avaliada em amostras de placa subgingival de pacientes com periodontite, por PCR e por cultura. *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* foram detectados em 40 (24,0%) amostras, por PCR, enquanto que, por cultura, foram observados em 25 (15,0%) e em 18 (11,0%) amostras,

respectivamente. Os autores observaram que a PCR mostrou-se mais eficiente que as técnicas microbiológicas convencionais para a detecção destes patógenos periodontais.

Massara (2001), avaliando a frequência de recuperação de *A. actinomycetemcomitans* de sítios periodontais, por PCR e por cultura, observou que essas duas técnicas permitiram a detecção do periodontopatógeno; entretanto, a PCR mostrou-se mais sensível, mais rápida e menos dispendiosa.

PCR *multiplex* foi desenvolvida para a detecção simultânea de diferentes patógenos periodontais por Tran e Rudney (1996) e por Garcia *et al.* (1998). Nos estudos de Tran e Rudney (1996), foram utilizados *primers* espécie-específicos para a detecção do rDNA 16S de *A. actinomycetemcomitans* e de *P. gingivalis* em espécimes obtidos de sulcos gengivais de indivíduos sem manifestações clínicas de doença periodontal. Os dados mostraram que a reação era altamente sensível e específica, permitindo a detecção simultânea dos microrganismos e podendo ser aplicada em estudos epidemiológicos e diagnósticos, de planejamento do tratamento e de monitoramento de infecção periodontal.

Como já mencionado, a diversidade microbiana nas bolsas periodontais pode ser subestimada quando se utiliza método de cultivo, já que apenas microrganismos cultiváveis nas condições empregadas no estudo poderão ser detectados. Por outro lado, embora PCR seja um método com especificidade e sensibilidade adequadas para avaliação da prevalência de patógenos periodontais, mesmo daqueles que ainda não podem ser isolados em meios de cultura artificiais, a PCR convencional não permite a quantificação destes microrganismos, importante para o conhecimento da etiopatogênese das doenças periodontais e, em consequência, para o diagnóstico e a terapêutica (KUBONIWA *et al.*, 2004; NONNENMACHER *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2004).

Vários métodos de análise quantitativa podem ser utilizados para detecção de patógenos orais, incluindo citometria de fluxo, hibridização DNA-DNA e,

mais recentemente, *real-time* PCR. Esta técnica emprega oligonucleotídeos marcados com corante fluorescente e, através de monitoramento contínuo da fluorescência, permite a detecção e a quantificação de produtos amplificados à medida que eles são sintetizados. O sistema TaqMan é baseado na atividade exonucleásica 5'-3' de uma *Taq* DNA polimerase e o produto da PCR é marcado com sonda fluorescente detectada por leitor a laser (NONNENMACHER *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2004). O método permite a quantificação dos produtos amplificados na fase log da reação, com limite de detecção de, aproximadamente,  $10^2$  cópias, possibilitando, assim, o monitoramento da terapia periodontal, bem como estudos epidemiológicos relacionados à progressão da doença (KUBONIWA *et al.*, 2004; NONNENMACHER *et al.*, 2004).

Utilizando a técnica *real-time* PCR, Nonnenmacher *et al.* (2004) demonstraram que *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *P. intermedia* estavam presentes em níveis mais elevados em pacientes com periodontite do que em indivíduos com periodonto saudável. Kuboniwa *et al.* (2004) puderam, também, relacionar *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*T. forsythensis*), *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola* e *P. intermedia* com doença periodontal, pois estas espécies bacterianas foram detectadas em números significativamente maiores no grupo de pacientes do que nos indivíduos com periodonto saudável. *P. nigrescens* foi a única espécie, dentre as analisadas pelos autores, observada em números elevados, tanto em indivíduos com periodonto saudável como naqueles com periodontite.

Para esclarecer a relação entre *P. gingivalis* e *status* periodontal, Kawada *et al.* (2004) fizeram uma análise quantitativa desta espécie bacteriana em pacientes com periodontite em estágios distintos, utilizando *real-time* PCR. Os autores encontraram uma correlação positiva entre o número de *P. gingivalis* e a profundidade de bolsa e também uma diminuição dos níveis do microrganismo após a terapia periodontal. A frequência de detecção de *T. forsythensis* e *Fusobacterium* spp. em espécimes de bolsas periodontais com diferentes profundidades foi analisada por Suzuki *et al.* (2004). Os

autores concluíram que os microrganismos estavam associados entre si e correlacionados com aumento da profundidade de bolsa periodontal.

O sucesso da avaliação microbiológica depende, portanto, de vários fatores, como seleção do espécime, métodos de colheita e transporte do material, assim como dos recursos tecnológicos disponíveis e do método escolhido para detecção dos microrganismos (MURRAY *et al.*, 1995).

De fato, as informações obtidas pelo emprego dos métodos genético e microbiológico tradicional são complementares. Enquanto a cultura permite a avaliação do perfil de susceptibilidade a drogas e a análise quantitativa de células viáveis em determinados sítios, o método genético permite a distinção entre espécies filogeneticamente relacionadas e é altamente sensível e específico para a detecção de espécies bacterianas, inclusive daquelas fastidiosas, cujo estudo, empregando-se técnicas microbiológicas convencionais, não seria possível (CHEN e SLOTS, 1999).



## 3 OBJETIVOS

### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, por cultura microbiológica e PCR, a ocorrência de periodontopatógenos Gram negativos em sítios periodontais de indivíduos com e sem manifestações clínicas de doença periodontal.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, pelo método de cultura microbiológica, a ocorrência de *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica ou agressiva e em sulcos gengivais de indivíduos sem manifestações clínicas de doença periodontal.
- Comparar o método bioquímico-fisiológico convencional com o sistema Rapid ID 32 A para identificação de bastonetes anaeróbios obrigatórios produtores de pigmento negro.
- Pesquisar, por PCR, a presença de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Fusobacterium* spp., *A. actinomycetemcomitans*, *E. corrodens*, *T. forsythensis* e *T. denticola* em bolsas periodontais de pacientes com periodontite crônica ou agressiva e em sulcos gengivais de indivíduos sem manifestações clínicas de doença periodontal.
- Avaliar a ocorrência de associações entre os periodontopatógenos detectados em espécimes subgengivais de pacientes com as diferentes manifestações clínicas periodontais e de indivíduos com periodonto saudável.

## 4 PACIENTES E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (ANEXO I). Termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado por todos os indivíduos incluídos no estudo (ANEXO II).

### 4.1 ETAPA CLÍNICA

#### 4.1.1 GRUPOS DE ESTUDO

No período de fevereiro de 2000 a dezembro de 2002 foram selecionados, ao acaso, 60 indivíduos (37 do sexo feminino, média de idade de 36 anos, faixa etária de 14 a 60 anos) com periodontite, atendidos, não consecutivamente, na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG). Entre estes, 30 pacientes (14 do sexo feminino, média de idade de 46 anos, faixa etária de 35 a 60 anos) apresentavam manifestações de periodontite crônica e 30 (23 do sexo feminino, média de idade de 26 anos, faixa etária de 14 a 37 anos) apresentavam sinais de periodontite agressiva.

Foram, ainda, incluídos no estudo 30 alunos do Curso de Graduação em Odontologia da PUC-MG (15 do sexo feminino, média de idade de 21 anos, faixa etária de 19 a 29 anos) com periodonto saudável.

O diagnóstico de periodontite foi realizado pela medida de profundidade à sondagem, empregando-se sondas milimetradas<sup>1</sup>, pela avaliação da presença de sangramento e exsudação e pelo exame radiográfico periapical.

O diagnóstico de periodontite crônica foi feito pela presença de pelo menos três sítios com bolsas periodontais com pelo menos 4mm de profundidade,

---

<sup>1</sup> Trinity, São Paulo, SP, Brasil

sangramento espontâneo ou à sondagem, reabsorção óssea horizontal, alteração na coloração do tecido gengival e presença de cálculo subgengival, conforme critérios propostos por Nyman e Lindhe (1999).

O diagnóstico de periodontite agressiva foi feito pela evidência clínica de perda de suporte periodontal, constatada por medidas de profundidade à sondagem de pelo menos 4mm, obrigatoriamente, nos primeiros molares e incisivos permanentes e, eventualmente, nos demais dentes (LÓPEZ *et al.*, 1996), pela presença obrigatória de sangramento com ou sem exsudação e de destruição óssea vertical (RIGGIO *et al.*, 1996).

Os dados clínicos dos indivíduos estudados foram registrados em ficha própria (ANEXO III).

Não foram incluídos no estudo indivíduos que eram tabagistas, que fizeram uso de antimicrobiano local ou sistêmico nos 3 meses anteriores à colheita da amostra, que haviam sido submetidos a tratamento periodontal anterior ou que apresentavam alterações sistêmicas.

#### **4.1.2 COLHEITA DE ESPÉCIMES CLÍNICOS**

Os espécimes dos pacientes com periodontite foram obtidos das bolsas periodontais que apresentavam maior profundidade, de pelo menos um sítio de cada quadrante da cavidade oral. Os espécimes subgengivais dos indivíduos com periodonto saudável foram obtidas da face mesial dos incisivos centrais e primeiros molares superiores.

Após isolamento relativo da área com roletes de algodão, cones de papel absorvente<sup>2</sup> esterilizados foram inseridos nas bolsas periodontais ou sulcos gengivais. Após 60 segundos, foram transferidos para tubo contendo 2 ml de solução de *Ringer Pre-Reduced Anaerobically Sterilized* (Ringer PRAS)

---

<sup>2</sup> Diadent, Burnaby, BC, Canadá

(SUTTER *et al.*, 1980), sob fluxo de CO<sub>2</sub>. Com auxílio de cureta periodontal<sup>3</sup> esterilizada, foi realizada raspagem de placa bacteriana subgingival e o material foi também transferido, nas mesmas condições, para solução de Ringer PRAS.

## 4.2 ETAPA LABORATORIAL

### 4.2.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os espécimes clínicos foram transportados para o Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, no prazo máximo de duas horas. Foram, então, submetidos à agitação em vórtex<sup>4</sup>, para dispersar a maior quantidade possível de microrganismos aderidos aos cones de papel. Em seguida, os frascos foram introduzidos em câmara anaeróbica<sup>5</sup> (atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 10% de H<sub>2</sub> e 85% de N<sub>2</sub>), onde foram realizadas diluições seriadas (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-4</sup>), em solução de Ringer PRAS. Alíquotas de 0,1 ml de cada diluição foram semeadas, com alça de Drigalski, em *Kanamycin Laked Blood Agar*<sup>6</sup> (SUMMANEN *et al.*, 1993) modificado (KLB) e *Brucella Agar*<sup>7</sup>, suplementado com hemina<sup>8</sup> (0,05mg/ml), menadiona<sup>9</sup> (0,01mg/ml), extrato de levedura<sup>10</sup> (5mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro (BA-S) (SUTTER *et al.*, 1980) para isolamento de bactérias anaeróbias produtoras de pigmento negro; meio seletivo para isolamento de fusobactérias da cavidade oral (Omata) (OMATA e DISRAELI, 1956); *Tryptic Soy Agar*<sup>11</sup> Serum-

---

<sup>3</sup> Trinity

<sup>4</sup> Biomatic, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>5</sup> Forma Scientific Company, Marietta, OH, USA

<sup>6</sup> Inlab, São Paulo, SP, Brasil

<sup>7</sup> Difco, Detroit, MI, USA

<sup>8</sup> Inlab

<sup>9</sup> Inlab

<sup>10</sup> Difco

<sup>11</sup> Difco

*Bacitracin*<sup>12</sup>-*Vancomycin*<sup>13</sup> (TSBV) (SLOTS, 1982) para o isolamento de *Actinobacillus* spp. e *Tryptic Soy Agar* acrescido de clindamicina<sup>14</sup> (5µg/ml) (SLEE e TANZER, 1978) para isolamento de *E. corrodens*.

A incubação foi realizada a 37°C, em câmara anaeróbica, por até 72 horas, com exceção dos meios de cultivo destinados ao isolamento de bactérias produtoras de pigmento negro, que foram incubados por até 15 dias.

A identificação preliminar dos grupos bacterianos estudados foi feita pela observação da morfologia colonial. Com base nestes achados, foi feita a contagem das colônias de cada grupo bacteriano, com exceção do *A. actinomycetemcomitans*, e repique para obtenção de cultura pura.

Para identificação dos isolados, foi realizado, inicialmente, teste respiratório, incubando-se as culturas em anaerobiose (câmara anaeróbica), microaerofilia (método da vela, em dessecador de vidro) e aerobiose (atmosfera ambiente), a 37°C, por 48 horas. Foi considerado anaeróbio obrigatório o microrganismo que se multiplicou apenas em condições de anaerobiose, microaerófilo aquele capaz de se multiplicar tanto em anaerobiose como em condições de microaerofilia e anaeróbio facultativo o microrganismo que se multiplicou em atmosfera ambiente, em microaerofilia e em anaerobiose.

As características morfotintoriais de todos os isolados foram analisadas, em esfregaços corados pelo método de Gram (Kopeloff modificado) (HOLDEMAN *et al.*, 1977), em microscópio óptico, com objetiva de imersão.

---

<sup>12</sup> Inlab

<sup>13</sup> Inlab

<sup>14</sup> Inlab

#### 4.2.2 IDENTIFICAÇÃO BIOQUÍMICO-FISIOLÓGICA DAS AMOSTRAS

Os testes de identificação foram realizados, a partir das culturas puras obtidas em meios específicos para cada grupo bacteriano, após 48 horas de incubação em anaerobiose (SUTTER *et al.*, 1980).

As amostras com características de bastonetes anaeróbios obrigatórios produtores de pigmento negro foram cultivadas em BA-S ou Caldo *Brucella*<sup>15</sup> suplementado com hemina (0,05mg/ml), menadiona (0,01mg/ml), extrato de levedura (5mg/ml) e L-cisteína<sup>16</sup> (0,5mg/ml) (CB-S). As colônias características do gênero *Fusobacterium* foram semeadas em *Tryptic Soy Agar* suplementado com extrato de levedura (5mg/ml), L-cistina<sup>17</sup> (0,75mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro (TSA<sub>1</sub>-S) e em *Tryptic Soy Broth*<sup>18</sup> suplementado com extrato de levedura (5mg/ml) e L-cisteína (0,5mg/ml) (TSB<sub>1</sub>-S). As colônias originadas de TSBV, com aspecto sugestivo de *A. actinomycetemcomitans*, foram cultivadas em *Tryptic Soy Agar* suplementado com extrato de levedura (5mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro (TSA-S) e em TSB<sub>1</sub>-S. As colônias características de *E. corrodens* foram semeadas em *Tryptic Soy Agar*, suplementado com hemina (0,05mg/ml), menadiona (0,01mg/ml), extrato de levedura (5mg/ml) e 5% de sangue desfibrinado de carneiro (TSA<sub>2</sub>-S) e em *Tryptic Soy Broth* suplementado com extrato de levedura (5mg/ml), hemina (0,05mg/ml), menadiona (0,01mg/ml) e L-cisteína (0,5mg/ml) (TSB<sub>2</sub>-S).

Para identificação dos microrganismos, foram utilizados os testes descritos a seguir, conforme protocolo padronizado pelo Laboratório.

---

<sup>15</sup> Difco

<sup>16</sup> Inlab

<sup>17</sup> Inlab

<sup>18</sup> Difco

- **Produção de catalase**

O teste foi realizado em lâmina de vidro, a partir de culturas em meios não suplementados com sangue. Gotas de peróxido de hidrogênio<sup>19</sup> 15% foram adicionadas sobre um fragmento da colônia; o teste foi considerado positivo quando houve formação de bolhas de gás (SUMMANEN *et al.*, 1993).

- **Produção de indol**

Foram inoculadas alíquotas de 0,3 ml de cultura, obtida em meio líquido, em 5 ml de Caldo Peptona<sup>20</sup>-Extrato de Levedura (PY), acrescido de triptofano<sup>21</sup> (1mg/ml). A leitura foi realizada pela adição de xilol<sup>22</sup> e reativo de Erlich. A reação foi considerada positiva quando houve formação de anel róseo na superfície do meio de cultura (HOLDEMAN *et al.*, 1977).

- **Motilidade e produção de H<sub>2</sub>S**

As culturas foram inoculadas, com auxílio de agulha bacteriológica, em Meio SIM<sup>23</sup> (H<sub>2</sub>S, indol e motilidade). Motilidade foi detectada pela presença de crescimento além do local de inoculação. O aparecimento de cor negra indicava a produção de H<sub>2</sub>S (HOLDEMAN *et al.*, 1977).

- **Hidrólise de esculina**

Foram inoculadas alíquotas de 0,3 ml de cultura em 5 ml de Caldo PY (HOLDEMAN *et al.*, 1977), acrescido de esculina<sup>24</sup> (1mg/ml). Após incubação, adicionou-se citrato férrico amoniacal<sup>25</sup>; o teste foi considerado positivo

---

<sup>19</sup> Synth, Diadema, SP, Brasil

<sup>20</sup> Difco

<sup>21</sup> Inlab

<sup>22</sup> Synth

<sup>23</sup> Difco

<sup>24</sup> Inlab

<sup>25</sup> Reagen, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

quando se observava escurecimento do meio sob luz ultravioleta (SUMMANEN *et al.*, 1993).

- **Fermentação de carboidratos**

Preparou-se uma suspensão de amostra bacteriana, a partir de 4,0 ml de cultura diluída em 96,0 ml de Caldo PY (pH entre 6,2 a 7,2). Foram transferidos 3,6 ml desta suspensão para tubos de ensaio esterilizados, acrescentando-se, em seguida, 0,4 ml de solução a 10% de cada carboidrato<sup>26</sup> a ser testado (concentração final 1%), esterilizado por filtração. Todos os testes foram realizados em duplicata (SUTTER *et al.*, 1980; SUMMANEN *et al.*, 1993).

Tubos teste contendo 4,0 ml das culturas diluídas em PY, sem carboidratos, foram incubados nas mesmas condições (controle negativo de fermentação, para comparação com o pH observado nos tubos teste).

A interpretação dos resultados baseou-se no valor médio do pH observado nos tubos contendo carboidrato, considerando-se:

Fermentação forte –  $\text{pH} \leq 5,5$

Fermentação fraca – pH 5,6 entre 5,8

Fermentação negativa -  $\text{pH} \geq 5,9$

- **Sensibilidade a fluoreto de sódio**

Alíquotas de 0,3 ml de cultura crescida em TSB<sub>1</sub>-S foram inoculadas em três tubos, um contendo TSB<sub>1</sub>-S, para avaliação da viabilidade da amostra, e os outros dois com TSB<sub>1</sub>-S acrescido de 10 µg/ml ou 100 µg/ml de fluoreto de sódio<sup>27</sup>. Os tubos foram, então, incubados a 37°C, por 48 horas. Quando houve multiplicação bacteriana no tubo contendo 10 µg/ml de fluoreto de sódio e inibição na concentração de 100 µg/ml do reagente, considerou-se o

---

<sup>26</sup> Inlab

<sup>27</sup> Merck, Rio de Janeiro, RJ, Brasil



resultado como sugestivo de *A. actinomycetemcomitans*. Em caso de dúvida em relação à multiplicação bacteriana no caldo (ausência de formação de grumos, de turvação do meio de cultura ou de aderência à parede do tubo), uma alíquota de 0,1 ml do mesmo foi transferida para TSA-S. Após 48 horas de incubação em dessecador de vidro, a 37°C, foi avaliada a viabilidade do microrganismo (KING e TATUM, 1962; FARIAS *et al.*, 1986).

- **Sensibilidade a bile**

A amostra bacteriana a ser testada foi semeada em meio contendo 20% de bile (*Bacteroides*-Bile<sup>28</sup>-Esculina/BBE). A amostra capaz de se multiplicar na superfície do ágar foi considerada resistente a bile (SUMMANEN *et al.*, 1993).

- **Produção de lipase**

A amostra bacteriana foi semeada em *Egg Yolk Agar* (EYA) e a cultura foi incubada em anaerobiose, a 37°C, por até 7 dias. Considerou-se o teste positivo quando se observou presença de brilho característico na superfície da colônia e no ágar ao redor das colônias do microrganismo (SUMMANEN *et al.*, 1993).

- **Produção de oxidase**

Cada amostra bacteriana foi transferida para uma tira de papel embebida em solução de tetrametil-para-fenilenodiamina<sup>29</sup> (PDF) 1%. A leitura foi realizada após 30 segundos, considerando-se a amostra produtora de oxidase quando ocorria alteração da cor da tira de papel, de branca para azul (BIER, 1984).

---

<sup>28</sup> Difco

<sup>29</sup> Laborclin, Pinhais, PR, Brasil

- **Sensibilidade a vancomicina, colistina e canamicina**

A amostra bacteriana foi semeada em *Brucella Agar* suplementado com hemina (0,05 mg/ml), menadiona (0,01 mg/ml), extrato de levedura (5mg/ml) e L-cistina (SUTTER *et al.*, 1980). Discos impregnados com vancomicina (5 µg), colistina (10 µg) e canamicina (1000 µg) foram colocados na superfície do ágar e, após incubação em anaerobiose, a 37°C, por 48 horas, a leitura foi realizada pela avaliação da presença e da medida do diâmetro das zonas de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco. O microrganismo foi considerado sensível quando a zona de inibição foi  $\geq 10$  mm e resistente quando o halo de inibição foi  $< 10$  mm (SUMMANEN *et al.*, 1993).

- **Detecção de atividade tripsinogênica**

A amostra bacteriana, a partir de cultura em CB-S, foi inoculada em 0,1 ml de tampão Tris-HCl<sup>30</sup> 0,1 M BANA (N-benzoil-DL-arginina-2-naftilamida<sup>31</sup>) 0,44% (pH 8,5). As culturas foram incubadas a 37°C, em aerobiose. Após 18 horas, foi adicionada uma gota de tampão Tris-HCl 2,0 M contendo SDS<sup>32</sup> 10% (pH 7,5) e uma gota de solução de *Sal Fast Blue* BB<sup>33</sup> em éter monometilglicoletileno<sup>34</sup>. Após 5 minutos, a leitura foi realizada, considerando-se o teste positivo quando havia mudança de coloração da suspensão bacteriana para alaranjada (LAUGHON *et al.*, 1982).

A identificação definitiva dos isolados foi realizada por comparação dos resultados obtidos nos testes com aqueles descritos em chaves de identificação (HOLDEMAN *et al.*, 1977; HOLT *et al.*, 1994; MURRAY *et al.*, 1995) (ANEXO IV).

Os bastonetes anaeróbios obrigatórios produtores de pigmento negro e as amostras com identificação presuntiva de *Fusobacterium* foram, também,

---

<sup>30</sup> Invitrogen, Paisley, Scotland

<sup>31</sup> Sigma, St. Louis, MO, USA

<sup>32</sup> Promega, Madison, WI, USA

<sup>33</sup> Icm Biomedicals, Aurora, OH, USA

<sup>34</sup> Reagen

identificados empregando-se o sistema de identificação comercial semi-automatizado RAPID ID 32A<sup>35</sup> (ANEXO V).

#### 4.2.3 MANUTENÇÃO DAS AMOSTRAS ISOLADAS

Durante a realização das provas de identificação, as bactérias anaeróbias obrigatórias foram mantidas em câmara anaeróbica e as bactérias microaerófilas em dessecador de vidro, em condições de microaerofilia. As amostras foram conservadas, em freezer -86°C, em meio líquido específico para cada grupo microbiano estudado, acrescido de glicerol<sup>36</sup> (concentração final 10%).

#### 4.2.4 IDENTIFICAÇÃO GENÉTICA DE PERIODONTOPATÓGENOS

Cerca de 1 ml da suspensão de cada espécime clínico, em Ringer PRAS, foi transferido para tubo de microcentrífuga e centrifugado, a 12000 x *g*, a 4°C, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento mantido em freezer -86°C, até o momento de sua utilização para extração de DNA.

- **Extração de DNA**

DNA das amostras foi extraído pelo método do fenol-clorofórmio (Fox *et al.*, 1994). Ao sedimento bacteriano, foi acrescentado tampão STET (sacarose<sup>37</sup> 8%, Tris-HCl 50 mM, EDTA<sup>38</sup> 50 mM, Triton X-100<sup>39</sup> 0,1%; pH 8,0) e

---

<sup>35</sup> BioMérieux SA, Maercy L'Etoile, França

<sup>36</sup> Synth

<sup>37</sup> Inlab

<sup>38</sup> Life, Gaithersburg, MD, USA

<sup>39</sup> Calbiochemn, La Jolla, CA, USA

lisozima<sup>40</sup> (concentração final 6 µg/µl). A mistura foi incubada a 37°C, por 12 minutos e, a seguir, foram adicionados SDS (concentração final 1,5%) e RNase A<sup>41</sup> (concentração final 0,02 µg/µl). O material foi homogeneizado e, após 1 hora de incubação a 37°C, foi adicionada proteinase K<sup>42</sup> (concentração final 0,7µg/µl). A suspensão foi homogeneizada e incubada a 37°C, *overnight*. Após este período, NaCl<sup>43</sup> (concentração final 0,7 µmol/µl) e solução contendo partes iguais de CTAB<sup>44</sup> 5% e NaCl 0,7 M (concentração final 1:10) foram adicionadas e a suspensão agitada delicadamente e incubada por 10 minutos a 56°C. DNA foi, então, extraído em igual volume de fenol<sup>45</sup> e clorofórmio<sup>46</sup> (1:1) e precipitado com acetato de sódio<sup>47</sup> 0,3 M (concentração final 2,6 µmol/µl) e, aproximadamente, 2 volumes de etanol absoluto<sup>48</sup>, a -20°C, *overnight*. A suspensão foi centrifugada a 15000 x *g*, por 75 minutos e, após evaporação do etanol residual, foram acrescentados dois volumes de etanol 70%. O material foi novamente centrifugado a 15000 x *g*, por 25 minutos, e o sedimento de DNA foi diluído em água quimicamente pura<sup>49</sup> estéril. A concentração de DNA de cada amostra foi medida em espectrofotômetro UV<sup>50</sup>, empregando-se comprimento de onda de 260 nm.

- **Reação de polimerização em cadeia (PCR)**

DNA obtido de todos os espécimes foi submetido à PCR para amplificação de rDNA 16S de eubactérias (controle positivo da extração de DNA) (SLOTS *et al.*, 1995). Apenas amostras rDNA 16S positivas foram empregadas no estudo.

---

<sup>40</sup> Calbiochemn

<sup>41</sup> Sigma

<sup>42</sup> Life

<sup>43</sup> Sigma

<sup>44</sup> Sigma

<sup>45</sup> Invitrogen

<sup>46</sup> Ecibra, Santo Amaro, SP, Brasil

<sup>47</sup> Sigma

<sup>48</sup> Synth

<sup>49</sup> LiChrosolv, Merck, Darmstadt, Alemanha

<sup>50</sup> RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Cambridge, Inglaterra

Para pesquisa de periodontopatógenos, foram empregados protocolos previamente descritos. Foram utilizados *primers* e condições de reação descritos por Conrads *et al.* (1997), para *Fusobacterium* spp. (*F. nucleatum*, *F. periodonticum* e *F. mortiferum*), por Ashimoto *et al.* (1996) para *P. intermedia* e *P. nigrescens* e por Slots *et al.* (1995) para *T. forsythensis*, *E. corrodens* e *T. denticola* (QUADRO 1). Todas as reações foram realizadas em termociclador MJ Research<sup>51</sup>.

Em resumo, 1 µl de DNA foi adicionado a mistura de reação contendo 10 pmol de cada *primer*, 1,25 U de *Taq* DNA polimerase<sup>52</sup>, 200 µM de cada deoxinucleotídeo<sup>53</sup> e cloreto de magnésio<sup>54</sup> (concentração final de 1,0 mM para *P. intermedia* e *P. nigrescens* e de 1,5 mM para *E. corrodens*, *T. denticola* e *T. forsythensis*). As reações foram submetidas a um período inicial de desnaturação a 95°C, por 2 minutos. Foram, então, submetidas a 35 ciclos consistindo de desnaturação a 95°C, por 30 segundos, anelamento a 60°C (para *E. corrodens*, *T. denticola* e *T. forsythensis*), 56°C (para *P. nigrescens*) ou 55°C (para *P. intermedia*) por 1 minuto e extensão a 72°C, por 1 minuto, seguidos por um período de extensão final a 72°C, por 2 minutos (para *E. corrodens*, *T. denticola* e *T. forsythensis*) ou 10 minutos (para *P. intermedia* e *P. nigrescens*).

---

<sup>51</sup> MJ Research, Watertown, MA, USA

<sup>52</sup> Invitrogen

<sup>53</sup> Promega

<sup>54</sup> Invitrogen

QUADRO 1 – *Primers* empregados para pesquisa de periodontopatógenos putativos por PCR e tamanho dos *amplicons*.

Organismo	Seqüência (5' – 3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Autor
Eubactéria	GATTAGATACCCTGGTAGTCCAC	602	16
	CCCGGGAACGTATTCACCG		
<i>Eikenella corrodens</i>	CTAATACCGCATACGTCCTTTTC	688	186
	CTACTAAGCAATCAAGTTGCC		
<i>Fusobacterium</i> spp.	GTCATCGTGACACAGAATTGCTG	360	35
	GGTTACCTTGTTACGACTT		
<i>Prevotella intermedia</i>	TTTGTTGGGGAGTAAAGCGGG	575	16
	TCAACATCTCTGTATCCTGCGT		
<i>Prevotella nigrescens</i>	ATGAAACAAAGGTTTTCCGGTAAG	804	16
	CCCACGTCTCTGTGGGCTGCCA		
<i>Tannerella forsythensis</i>	GCGTATGTAACCTGCCCGCA	641	186
	TGCTTCAGTGTCAGTTATACCT		
<i>Treponema denticola</i>	TAATACCGAATGTGCTCATTTACAT	316	186
	TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTCTTA		

Para detecção de *Fusobacterium* spp., 1 µl de DNA foi adicionado à mistura de reação contendo 5 pmol de cada *primer*, 1,0 U de *Taq* DNA polimerase, 200 µM de cada deoxinucleotídeo e cloreto de magnésio (concentração final de 1,0 mM). As reações foram submetidas a 35 ciclos de desnaturação a 94°C, por 1 minuto, anelamento a 60°C, por 1 minuto, e extensão a 72°C, por 2 minutos e 30 segundos.

Quando o resultado da PCR foi positivo, a amostra de DNA foi diluída ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) em água quimicamente pura e, em seguida, submetida a novas reações, nas mesmas condições descritas anteriormente, para avaliação dos níveis de cada microrganismo.

Para pesquisa de *P. gingivalis*, foram empregados protocolos propostos por Slots *et al.* (1995) e por Tran e Rudney (1996) e para investigação da presença de *A. actinomycetemcomitans*, metodologia descrita por Goncharoff *et al.* (1993), Tonjum e Haas (1993), Ashimoto *et al.* (1996) e Tran e Rudney (1996) foram utilizadas (QUADROS 2 e 3). Diversas modificações nos protocolos das reações foram testadas, como alterações das concentrações de  $MgCl_2$ , *primers* e *Taq* DNA polimerase, das temperaturas de anelamento e do número de ciclos, entre outras.

- Detecção de produtos amplificados

Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de poli-acrilamida<sup>55</sup>, empregando-se tampão Tris-borato<sup>56</sup>-EDTA, por cerca de 90 minutos, a 100 V. O gel foi corado com brometo de etídio <sup>57</sup>(1  $\mu$ g/ml) por cerca de 5 minutos e observado em transluminador de luz ultravioleta<sup>58</sup>. Como marcador de peso molecular, foi utilizado o padrão de 100 pb<sup>59</sup>.

---

<sup>55</sup> Sigma

<sup>56</sup> Synth

<sup>57</sup> Sigma

<sup>58</sup> Cole-Parmer, Vernon Hills, Illinois, USA

<sup>59</sup> Life Technologies, Gaithersburg, MD, Estados Unidos

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os cálculos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo foram realizados conforme Jekel *et al.* (1999).

Foram utilizados os testes de  $\chi^2$  com correção de Yates ou exato de Fisher bicaudal, quando indicado, considerando-se as diferenças significativas quando  $p < 0,05$ . Estes cálculos foram realizados empregando-se o *software* EpiInfo<sup>60</sup>.

QUADRO 2 – *Primers* para detecção de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* por PCR.

Organismo	Seqüência (5' - 3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Autor
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	GGAATTCCTAGGTATTGCGAAACAATTTGATC	262	65
	GGAATTCCTGAAATTAAGCTGGTAATC		
	TCGCGAATCAGCTCGCCG	285	222
	GCTTTGCCAGCTCCTCACC		
	AAACCCATCTCTGAGTTCTTCTTC	557	16
	ATGCCAACTTGACGTAAAT		
	ATTGGGGTTTAGCCCTGGTG	377	224
	ACGTCATCCCCACCTTCCTC		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG	404	186
	ACTGTTAGCAACTACCGATGT		
	TGTAGATGACTGATGGTGAAAACC	208	224
	ACGTCATCCCCACCTTCCTC		



QUADRO 3 – Protocolos de reação empregados para detecção de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* por PCR.

Organismo	Mix (volume final: 20 µl)					Anelamento (°C)	Autor
	Primer (pmol)		dNTP (µM)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Taq (U)		
	F	R					
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	10	10	250	2,5	0,5	55,0	65
	20	20	200	1,5	0,5	55,0	222
	10	10	200	1,0	0,5	55,0	16
	5	10	200	2,5	1,4	60,7	224
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	10	10	200	1,5	0,5	60,0	186
	16	10	200	2,5	1,4	60,7	224

F: *forward*, R: *reverse*; dNTP: desoxinucleotídeos; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; Taq: Taq DNA polimerase

#### 4.4 ASSOCIAÇÕES ENTRE OS GRUPOS BACTERIANOS MAIS FREQUENTEMENTE DETECTADOS

A probabilidade de ocorrência de relações antagônicas e cooperativas entre os microrganismos presentes nos espécimes clínicos foi calculada como descrito por Hillman *et al.* (1985). Foram testados todos os grupos bacterianos recuperados com frequência acima de 20%. O risco relativo de se detectar a amostra teste na presença da efetora foi calculado pela proporção de sítios onde a amostra teste foi encontrada juntamente com a amostra efetora dividido pelo número de sítios onde a amostra teste estava presente sem a efetora. Valores superiores a 2,0 e inferiores a 0,5 indicavam associação positiva e negativa, respectivamente.

<sup>60</sup> <http://www.cdc.gov/epiinfo>

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ESTUDO MICROBIOLÓGICO

#### 5.1.1 CULTURA

Entre os pacientes com periodontite crônica, a taxa média de recuperação de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro foi de  $3,03 \times 10^6$  UFC/ml (de  $2,0 \times 10^3$  a  $3,0 \times 10^7$ ), o número médio de UFC típicas de *E. corrodens* foi de  $1,51 \times 10^5$ /ml (de  $1,0 \times 10^4$  a  $9,0 \times 10^5$ ) e a taxa de isolamento de *Fusobacterium* spp. foi de  $4,9 \times 10^5$  UFC/ml (de  $2 \times 10^2$  a  $5,2 \times 10^6$ ) (GRÁF. 1).

Para os pacientes com periodontite agressiva, a taxa média de isolamento de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro, *E. corrodens* e *Fusobacterium* spp. foi de  $1,3 \times 10^6$  UFC/ml (de  $2,0 \times 10^4$  a  $1,2 \times 10^7$ ),  $6,87 \times 10^4$  UFC/ml (de  $4,0 \times 10^2$  a  $4,6 \times 10^5$ ) e de  $3,3 \times 10^5$  UFC/ml (de  $3,0 \times 10^3$  a  $4,7 \times 10^6$ ), respectivamente (GRÁF. 2).

No que se refere aos indivíduos com periodonto saudável, as taxas médias de isolamento foram menores que as observadas nos pacientes com periodontite: de  $3,0 \times 10^3$  UFC/ml para *Fusobacterium* (de  $3,0 \times 10^2$  a  $6,0 \times 10^4$ ) e de  $3,0 \times 10^3$  UFC/ml (de  $4,0 \times 10^1$  a  $9,0 \times 10^4$ ) para *E. corrodens* (GRÁF. 3).

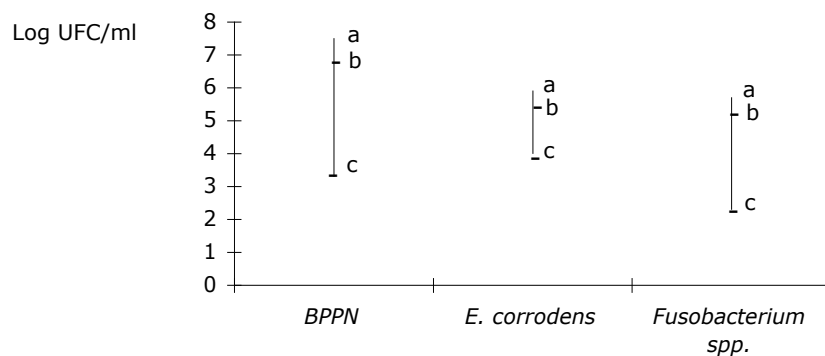


GRÁFICO 1 – Níveis populacionais de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro (BPPN), *E. corrodens* e *F. nucleatum* recuperados de pacientes com periodontite crônica.  
a: nível máximo, b: média dos níveis e c: nível mínimo

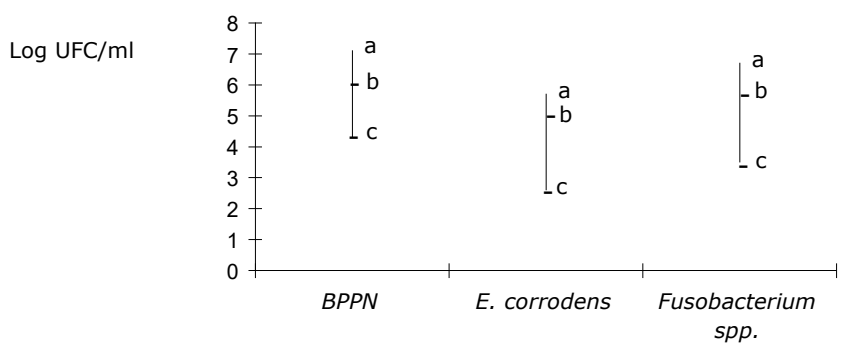


GRÁFICO 2 – Níveis populacionais de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro (BPPN), *E. corrodens* e *F. nucleatum* recuperados de pacientes com periodontite agressiva  
a: nível máximo, b: média dos níveis e c: nível mínimo

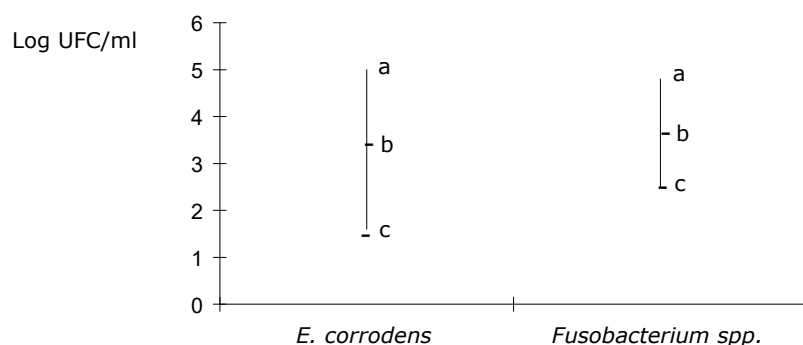


GRÁFICO 3 – Níveis populacionais de *E. corrodens* e *F. nucleatum* recuperados de indivíduos com periodonto saudável  
a: nível máximo, b: média dos níveis e c; nível mínimo

Referente ao grupo de pacientes com periodontite crônica, *P. intermedia/nigrescens* foi isolada de 63,3% (19/30), *P. loescheii* de 3,3% (1/30), *P. oralis* de 3,3% (1/30), *Porphyromonas* spp. de 10,0% (3/30), *F. nucleatum* de 73,3% (22/30), *Fusobacterium varium* de 26,7% (8/30), *E. corrodens* de 10,0% (3/30) e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* de 16,7% (5/30) (TAB. 1).

Considerando-se os pacientes com periodontite agressiva, *P. intermedia/nigrescens* foi recuperada de 80,0% (24/30), *P. oralis* de 13,3% (4/30), *P. loescheii* de 13,3% (4/30), *Porphyromonas* spp. de 10,0% (3/30), *F. nucleatum* de 33,3% (10/30), *F. varium* de 6,7% (2/30), *E. corrodens* de 20,0% (6/30) e *A. actinomycetemcomitans* de 26,7% (8/30) (TAB. 1).

No que se refere ao grupo com periodonto saudável, *F. nucleatum* e *E. corrodens* foram isolados de 16,7% (5/30) e de 6,6% (2/30) indivíduos, respectivamente (TAB. 1).

Observou-se associação estatisticamente significativa entre *P. intermedia/nigrescens* e periodontite crônica ( $p < 10^{-5}$ ; OR = não determinada; IC 95% = não determinado) e periodontite agressiva ( $p < 10^{-6}$ ; OR = não determinada; IC 95% = não determinado). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando pacientes com periodontite agressiva foram comparados com pacientes com periodontite crônica ( $p = 0,25$ ; OR = 0,4; IC 95% = 0,1 a 1,6). *F. nucleatum* estava estatisticamente associado com periodontite crônica ( $p < 10^{-3}$ ; OR = 13,8; IC 95% = 3,4 a 59,8), mas não se mostrou associado com periodontite agressiva ( $p = 0,23$ ; OR = 2,5; IC 95% = 0,6 a 10,8). De forma semelhante, *F. varium* estava associado apenas com periodontite crônica ( $p = 0,005$ ; OR = não determinada; IC 95% = não determinado). Associação estatisticamente significativa foi observada entre *A. actinomycetemcomitans* e periodontite agressiva ( $p = 0,005$ ; OR = não determinada; IC 95% = não determinado), mas não entre o microrganismo e periodontite crônica ( $p = 0,05$ ; OR = não determinada; IC 95% = não determinado) (TAB. 2). *P. oralis*, *P. loescheii*, *Porphyromonas* spp. e *E. corrodens* não estavam

estatisticamente associados com qualquer das duas formas de periodontite estudadas.

TABELA 1 – Frequência de microrganismos isolados de espécimes subgingivais de pacientes com periodontite e de indivíduos com periodonto saudável.

Microrganismo	Número de indivíduos (%) com:			Total
	Periodontite crônica	Periodontite agressiva	Periodonto saudável	
<i>Prevotella intermedia/</i>	19	24	0	43
<i>nigrescens</i>	(63,3)	(80,0)		(47,0)
<i>Prevotella</i>	1	4	0	5
<i>oralis</i>	(3,3)	(13,3)		(5,5)
<i>Prevotella</i>	1	4	0	5
<i>loescheii</i>	(3,3)	(13,3)		(5,5)
<i>Porphyromonas</i> spp.	3	3	0	6
	(10,0)	(10,0)		(6,7)
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	22	10	5	37
	(73,3)	(33,3)	(16,7)	(41,1)
<i>Fusobacterium varium</i>	8	2	0	10
	(26,7)	(6,7)		(11,1)
<i>Eikenella</i>	3	6	2	11
<i>corrodens</i>	(10,0)	(20,0)	(6,7)	(12,2)
<i>Actinobacillus</i>	5	8	0	13
<i>actinomycetemcomitans</i>	(16,7)	(26,7)		(14,4)

TABELA 2 – Associação entre periodontopatógenos putativos, detectados por cultura microbiológica, e *status* periodontal.

Microrganismo	Periodontite					
	Crônica			Agressiva		
	p	OR	IC95%	p	OR	IC95%
<i>Prevotella</i>						
<i>intermedia/nigrescens</i>	< 10 <sup>5</sup>	ND	ND	< 10 <sup>6</sup>	ND	ND
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	< 10 <sup>3</sup>	13,8	3,4 a 59,8	0,23	2,5	0,6 a 10,8
<i>Fusobacterium varium</i>	0,005	ND	ND	0,20	2,5	0,5 a 12,8
<i>Actinobacillus actinomycetem-comitans</i>	0,005	ND	ND	0,005	ND	ND

OR: *odds ratio*, IC: intervalo de confiança, ND: não detectável

Bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro foram isolados de espécimes subgingivais de 21 (70,0%) pacientes com periodontite crônica e de 25 (83,3%) com periodontite agressiva, em meios de cultura seletivo e não seletivo. No que se refere ao KLB, o gênero *Prevotella* foi recuperado de 24 (52,2%) dos 46 espécimes, sendo 2 de pacientes com periodontite crônica e 22 daqueles com periodontite agressiva. *Porphyromonas* sp. foi cultivada a partir de apenas 1 (2,2%) espécime, obtido de paciente com periodontite crônica. *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp. foram isoladas, em BA-S, de 38 (82,6%) e 5 (10,9%) espécimes clínicos, respectivamente. Entre eles, *Prevotella* spp. foi recuperada de amostras obtidas de 17 pacientes com periodontite crônica e de 21 com a forma agressiva da doença e *Porphyromonas* spp. de espécimes subgingivais de 2 pacientes com periodontite crônica e de 3 com periodontite agressiva.

No que se refere à identificação de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro, observou-se que, por testes bioquímicos convencionais, 73,4% (212/289) das amostras foram identificadas como *P.*

*intermedia/nigrescens*, 18,3% (53/289) como *Porphyromonas* spp. e 8,3% (24/289) como *Prevotella* spp. Quando o kit RAPID ID 32A foi utilizado, 89,6% (259/289) das amostras isoladas foram identificadas como *P. intermedia/nigrescens*, 4,8% (14/289) como *P. oralis*, 2,8% (8/289) como *P. loescheii* e 2,8% (8/289) como *Porphyromonas* spp. Observou-se que 84,9% (45/53) das amostras reconhecidas como *Porphyromonas* spp., por testes bioquímicos convencionais, foram identificadas pelo RAPID ID 32A como *P. intermedia/nigrescens*. A identificação de *P. loescheii* e *P. oralis* só foi possível com o uso do kit RAPID ID 32A.

### 5.1.2 MÉTODO GENÉTICO

rDNA 16S foi detectado em todos os espécimes estudados, tanto de pacientes com periodontite como de indivíduos com periodonto saudável.

A pesquisa de *A. actinomycetemcomitans* e de *P. gingivalis* não pôde ser realizada empregando-se PCR. As reações utilizadas não apresentaram sensibilidade e especificidade adequadas, mesmo com as alterações introduzidas nos protocolos propostos.

*P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Fusobacterium* spp. (*F. nucleatum*, *F. periodonticum* e *F. mortiferum*), *E. corrodens*, *T. forsythensis* e *T. denticola* foram detectados, por PCR, em espécimes subgengivais de 42,9% (12/28), 73,3% (22/30), 96,2% (25/26), 93,3% (28/30), 76,7% (23/30) e 96,7% (29/30) dos pacientes com periodontite crônica, respectivamente (TAB. 3).

No grupo de pacientes com periodontite agressiva, *P. intermedia* foi detectada em 55,1% (16/29), *P. nigrescens* em 72,4% (21/29), *Fusobacterium* spp. em 88,0% (22/25), *E. corrodens* em 86,2% (25/29), *T. forsythensis* em 63,3% (19/30) e *T. denticola* em 90,0% (27/30) das amostras subgengivais (TAB. 3).

No que se refere a indivíduos com periodonto saudável, *Fusobacterium* spp., *E. corrodens*, *T. forsythensis* e *T. denticola* foram detectados, respectivamente, em 7,1% (2/28), 66,7% (20/30), 13,3% (4/30) e 26,7% (8/30) dos espécimes subgengivais (TAB. 3).

TABELA 3 – Frequência de detecção de microrganismos em espécimes subgengivais de pacientes com periodontite e de indivíduos com periodonto saudável por PCR.

Microrganismo	Número de indivíduos (%) com			Total
	Periodontite crônica	Periodontite agressiva	Periodonto saudável	
<i>Prevotella intermedia</i>	12 <sup>a</sup> /28 <sup>b</sup> (42,9)	16/29 (55,1)	0/30	28/87 (32,2)
<i>Prevotella nigrescens</i>	22/30 (73,3)	21/29 (72,4)	0/30	43/89 (48,3)
<i>Fusobacterium</i> spp.	25/26 (96,2)	22/25 (88,0)	2/28 (7,14)	49/79 (72,0)
<i>Eikenella corrodens</i>	28/30 (93,3)	25/29 (86,2)	20/30 (66,7)	73/89 (82,0)
<i>Tannerella forsythensis</i>	23/30 (76,7)	19/30 (63,3)	4/30 (13,3)	46/90 (51,1)
<i>Treponema denticola</i>	29/30 (96,7)	27/30 (90,0)	8/30 (26,7)	61/90 (67,8)

<sup>a</sup>: indivíduos cujo resultado foi positivo, <sup>b</sup>: indivíduos estudados

Todos os microrganismos pesquisados estavam estatisticamente associados com as formas agressiva e crônica de periodontite, exceto no que se refere a *E. corrodens*, que se mostrou associada apenas com periodontite crônica. Estes resultados encontram-se na tabela 4.



TABELA 4 – Associação entre periodontopatógenos putativos, detectados por PCR, e *status* periodontal.

Microrganismo	Periodontite					
	Crônica			Agressiva		
	p	OR	IC95%	p	OR	IC95%
<i>Prevotella intermedia</i>	< 10 <sup>-3</sup>	ND	ND	< 10 <sup>-4</sup>	ND	ND
<i>Prevotella nigrescens</i>	< 10 <sup>-6</sup>	ND	ND	< 10 <sup>-6</sup>	ND	ND
<i>Fusobacterium</i> spp.	< 10 <sup>-6</sup>	325,0	23,1 a 13796,9	< 10 <sup>-6</sup>	95,3	11,9 a 1035,6
<i>Eikenella corrodens</i>	0,02	7,0	1,25 a 70,3	0,14	3,1	0,74 a 15,5
<i>Tannerella forsythensis</i>	< 10 <sup>-4</sup>	21,4	4,8 a 107,1	< 10 <sup>-3</sup>	11,2	2,7 a 53,6
<i>Treponema denticola</i>	< 10 <sup>-5</sup>	79,8	9,2 a 3399,0	< 10 <sup>-4</sup>	24,8	5,1 a 151,3

OR: odds ratio, IC: intervalo de confiança, ND: não detectável

No grupo de pacientes com periodontite crônica, *P. intermedia* foi detectada, na maioria dos espécimes, até a diluição 10<sup>-2</sup>, *Fusobacterium* spp. até 10<sup>-1</sup>, *P. nigrescens* até 10<sup>-1</sup>, *E. corrodens* até 10<sup>-2</sup>, *T. forsythensis* até 10<sup>-3</sup> e *T. denticola* até 10<sup>-3</sup> (TAB. 5).

Na maioria dos espécimes de pacientes com periodontite agressiva, *Fusobacterium* spp. foi detectado até a diluição 10<sup>-1</sup>, *P. intermedia* até 10<sup>-2</sup>, *E. corrodens* até 10<sup>-2</sup>, *P. nigrescens* até 10<sup>-1</sup>, *T. forsythensis* até 10<sup>-3</sup> e *T. denticola* até 10<sup>-4</sup> (TAB. 6).

Nos indivíduos com periodonto saudável, *Fusobacterium* spp. e *T. forsythensis* foram detectados, respectivamente, até as diluições 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-3</sup>. Na maioria destes espécimes, *E. corrodens* foi identificada, até a diluição 10<sup>-1</sup> e *T. denticola* até 10<sup>-2</sup> (TAB. 7).

TABELA 5 – Maior diluição na qual cada periodontopatógeno putativo foi detectado, por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite crônica.

Espécies bacterianas	Sem diluição	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
<i>Prevotella intermedia</i>	25,0% (3 <sup>a</sup> /12 <sup>b</sup> )	8,3% (1/12)	66,7% (8/12)	0	0	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	22,7% (5/22)	59,1% (13/22)	0	18,2% (4/22)	0	0
<i>Fusobacterium</i> spp.	28,0% (7/25)	72,0% (18/25)	0	0	0	0
<i>Eikenella corrodens</i>	14,3% (4/28)	17,9% (5/28)	39,3% (11/28)	21,4% (6/28)	0	0
<i>Tannerella forsythensis</i>	0	21,7% (5/23)	0	78,3% (18/23)	0	0
<i>Treponema denticola</i>	0	3,4% (1/29)	20,7% (6/29)	44,8% (13/29)	17,2% (5/29)	13,8% (4/29)

<sup>a</sup>: indivíduos cujo resultado foi positivo, <sup>b</sup>: indivíduos estudados

TABELA 6 – Maior diluição na qual cada periodontopatógeno putativo foi detectado, por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite agressiva.

Espécies bacterianas	Sem diluição	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
<i>Prevotella intermedia</i>	6,3% (1 <sup>a</sup> /16 <sup>b</sup> )	6,3% (1/16)	87,5% (14/16)	0	0	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	0	57,1% (12/21)	4,8% (1/21)	28,6% (6/21)	4,8% (1/21)	0
<i>Fusobacterium</i> spp.	22,7% (5/22)	77,3% (17/22)	0	0	0	0
<i>Eikenella corrodens</i>	4,0% (1/25)	12,0% (3/25)	44,0% (11/25)	40,0% (10/25)	0	0
<i>Tannerella forsythensis</i>	10,5% (2/19)	10,5% (2/19)	5,3% (1/19)	63,2% (12/19)	10,5% (2/19)	0
<i>Treponema denticola</i>	0	14,8% (4/27)	7,4% (2/27)	14,8% (4/27)	40,7% (11/27)	22,3% (6/19)

<sup>a</sup>: indivíduos cujo resultado foi positivo, <sup>b</sup>: indivíduos estudados

O nível de detecção de microrganismos nos dois grupos de pacientes com periodontite foi semelhante, exceto para *T. denticola*, que foi identificada em diluição mais elevada no grupo de pacientes com periodontite agressiva.

Quando os níveis de detecção de periodontopatógenos em indivíduos com periodonto sadio foram comparados com aqueles dos pacientes com periodontite, observou-se que *Fusobacterium* spp. e *T. forsythensis* estavam presentes em níveis semelhantes nos três grupos de indivíduos. *E. corrodens* foi detectada em níveis mais altos nos dois grupos de pacientes com periodontite (TAB. 7).

TABELA 7- Maior diluição na qual cada periodontopatógeno putativo foi detectado, por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodonto saudável.

Espécies bacterianas	Sem diluição	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
<i>Fusobacterium</i> spp.	0	100,0% (2/2)	0	0
<i>Eikenella corrodens</i>	15,0% (3 <sup>a</sup> /20 <sup>b</sup> )	35,0% (7/20)	30,0% (6/20)	20,0% (4/20)
<i>Tannerella forsythensis</i>	0	0	0	100,0% (4/4)
<i>Treponema denticola</i>	12,5% (1/8)	0	62,5% (5/8)	25,0% (2/8)

<sup>a</sup>: indivíduos cujo resultado foi positivo, <sup>b</sup>: indivíduos estudados

## 5.2 COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICO CLÁSSICO E GENÉTICO

Sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo e negativo da cultura, quando comparada com PCR, e da PCR, quando se considerou a cultura como padrão ouro, encontram-se nos quadros 4 e 5, respectivamente.

QUADRO 4 - Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo da cultura quando comparada com a PCR, em pacientes com periodontite ou com periodonto saudável.

Status periodontal	Microrganismo	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Valor preditivo	
				Positivo (%)	Negativo (%)
Periodontite Crônica	<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	69,2	75,0	94,7	27,3
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	72,0	NC	94,7	NC
	<i>Eikenella corrodens</i>	10,7	100,0	100,0	7,4
Periodontite Agressiva	<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	80,7	33,3	91,3	16,7
	<i>Fusobacterium spp.</i>	36,6	33,3	80,0	6,7
	<i>Eikenella corrodens</i>	20,0	75,0	83,3	13,0
Periodonto Saudável	<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	NC	100,0	NC	1,0
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	50,0	84,6	25,0	95,7
	<i>Eikenella corrodens</i>	5,0	90,0	50,0	32,1

NC: não calculável.

QUADRO 5 - Sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo da PCR quando comparada com a cultura, em pacientes com periodontite ou com periodonto saudável.

Status periodontal	Microorganismo	Sensibilidade(%)	Especificidade (%)	Valor preditivo	
				Positivo (%)	Negativo (%)
Periodontite Crônica	<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	94,7	27,3	69,2	75,0
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	94,7	NC	72,0	NC
	<i>Eikenella corrodens</i>	100,0	7,4	10,7	100,0
Periodontite Agressiva	<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	91,3	16,7	80,7	33,3
	<i>Fusobacteirum spp.</i>	80,0	6,7	36,4	33,3
	<i>Eikenella corrodens</i>	83,3	13,0	20,0	75,0
Periodonto Saudável	<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	NC	100,0	1,0	NC
	<i>Fusobacteirum nucleatum</i>	20,0	05,7	50,0	84,6
	<i>Eikenella corrodens</i>	50,0	32,1	5,0	90,0

NC: não calculável

Os resultados obtidos, quando se comparou a eficiência da PCR e a cultura microbiológica, independente do *status* periodontal, estão apresentados nos quadros 6, 7 e 8.

QUADRO 6 – Detecção de *Prevotella intermedia/nigrescens* em espécimes subgingivais de indivíduos com e sem periodontite por cultura e PCR.

PCR	Cultura		Total
	Positiva nº (%)	Negativa nº (%)	
Positiva	39 (43,8%)	13 (14,6%)	52
Negativa	3 (3,4%)	34 (38,2%)	37
Total	42	47	89

QUADRO 7 – Detecção de *Fusobacterium nucleatum* em espécimes subgingivais de indivíduos com e sem periodontite por cultura e PCR.

PCR	Cultura		Total
	Positiva nº (%)	Negativa nº (%)	
Positiva	27 (34,2%)	22 (27,8%)	49
Negativa	7 (8,9%)	23 (29,1%)	30
Total	34	45	79

QUADRO 8 – Detecção de *Eikenella corrodens* em espécimes subgingivais de indivíduos com e sem periodontite por cultura e PCR.

PCR	Cultura		Total
	Positiva nº (%)	Negativa nº (%)	
Positiva	9 (10,1%)	64 (71,9%)	73
Negativa	2 (2,3%)	14 (15,7%)	16
Total	11	78	89

### 5.3 ASSOCIAÇÕES ENTRE GRUPOS MICROBIANOS MAIS FREQUENTEMENTE DETECTADOS

Os valores relativos a associações positivas e negativas detectadas entre os grupos bacterianos mais frequentemente recuperados por cultura microbiológica dos pacientes com periodontite estão listados nas tabelas 8 e 9. Em relação aos pacientes com periodontite crônica, observou-se associação positiva entre *F. varium* e *F. nucleatum* (OR = 2,46). Associações negativas, detectadas somente nos pacientes com periodontite agressiva, foram observadas entre *F. nucleatum* e *E. corrodens* (OR = 0,43), *E. corrodens* e *F. nucleatum* (OR = 0,40), *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans* (OR = 0,00) e *A. actinomycetemcomitans* e *E. corrodens* (OR = 0,00).



TABELA 8 – Valores relativos a associações entre grupos bacterianos isolados de pacientes com periodontite crônica.

Grupos bacterianos	Grupos bacterianos associados		
	<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Fusobacterium varium</i>
<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	-	0,78	1,27
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,82	-	1,30
<i>Fusobacterium varium</i>	1,78	2,46	-

Tabela 9 – Valores relativos a associações entre grupos bacterianos isolados de pacientes com periodontite agressiva.

Grupos bacterianos	Grupos bacterianos associados			
	<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Actinobacillus actinomycetem comitans</i>
<i>Prevotella Intermedia nigrescens</i>	-	0,67	1,05	1,14
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	0,58	-	0,43	0,69
<i>Eikenella corrodens</i>	1,31	0,40	-	0
<i>Actinobacillus actinomycetem comitans</i>	1,81	0,66	0	-

Empregando-se os dados do diagnóstico por PCR para cálculo de associações, relações negativas foram mais detectadas no grupo com periodontite crônica e associações positivas no grupo com agressiva.

Nos pacientes com periodontite crônica, foram observadas associações antagônicas entre *P. nigrescens* e *P. intermedia* (OR = 0,44), *T. denticola* e *T. forsythensis* (OR = 0,41) e *P. intermedia* e *T. denticola* (OR = 0,38) (TAB. 10).

Nos indivíduos com periodontite agressiva, associações positivas foram observadas entre *T. forsythensis* e *E. corrodens* (OR = 2,72), *E. corrodens* e *T. denticola* (OR = 2,69), *P. intermedia* e *E. corrodens* (OR = 2,40), *P. nigrescens* e *Fusobacterium* spp. (OR = 2,06), *T. forsythensis* e *Fusobacterium* spp. (OR = 2,06) e *T. forsythensis* e *T. denticola* (OR = 2,02). A única associação negativa detectada neste grupo de pacientes foi entre *T. denticola* e *T. forsythensis* (OR = 0,31) (TAB. 11).

Em relação aos indivíduos com periodonto saudável, relação positiva foi detectada apenas entre *T. denticola* e *E. corrodens* (OR = 3,5) (TAB. 12).

Tabela 10 - Valores relativos a associações entre grupos bacterianos, detectados por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite crônica.

Grupos bacterianos	Grupos bacterianos associados					
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>T. forsythensis</i>	<i>T. denticola</i>
<i>Prevotella intermedia</i>	-	0,72	NC	NC	1,48	0,38
<i>Prevotella nigrescens</i>	0,44	-	0,68	0,71	1,10	0,72
<i>Fusobacterium</i> spp.	1,04	0,82	-	1,71	0,96	0,82
<i>Eikenella corrodens</i>	1,17	0,90	0,96	-	0,91	0,93
<i>Tannerella forsythensis</i>	1,20	0,96	NC	0,75	-	0,76
<i>Treponema denticola</i>	1,23	0,95	0,96	0,96	0,41	-

NC: não calculável

Tabela 11 - Valores relativos a associações entre grupos bacterianos, detectados por PCR, em espécimes subgingivais de pacientes com periodontite agressiva.

Grupos bacterianos	Grupos bacterianos associados					
	<i>Prevotella intermedia</i>	<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Tannerella forsythensis</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Prevotella intermedia</i>	-	1,14	1,67	2,40	0,96	NC
<i>Prevotella nigrescens</i>	1,08	-	2,06	0,96	0,78	1,76
<i>Fusobacterium</i> spp.	1,07	1,20	-	1,52	1,25	1,10
<i>Eikenella corrodens</i>	1,21	0,98	1,28	-	1,22	2,69
<i>Tannerella forsythensis</i>	1,01	0,52	2,06	2,72	-	2,02
<i>Treponema denticola</i>	1,29	1,02	0,90	1,92	0,31	-

NC: não calculável

TABELA 12 - Valores relativos a associações entre grupos bacterianos, detectados por PCR, em espécimes subgingivais de indivíduos com periodonto saudável.

Grupos bacterianos	Grupos bacterianos associados	
	<i>Eikenella corrodens</i>	<i>Treponema denticola</i>
<i>Eikenella corrodens</i>	-	1,49
<i>Treponema denticola</i>	3,5	-

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 MÉTODOS EMPREGADOS

As alterações qualitativas e quantitativas da microbiota da cavidade oral associadas à gênese da doença periodontal têm intrigado os investigadores há mais de 20 anos. Embora diversos aspectos da etiopatogenia da doença tenham sido elucidados, o conhecimento do tema é, ainda, limitado. Investigações que contribuam para o esclarecimento da biologia dos microrganismos envolvidos e de sua interação com o hospedeiro, certamente, fornecerão subsídios para o delineamento de estratégias de prevenção e controle da doença e para abordagem terapêutica adequada dos pacientes (TANNER e BOULDIN, 1989).

Admite-se, atualmente, que as doenças periodontais são infecções polimicrobianas de natureza endógena (NISHIHARA e KOSEKI, 2004). Segundo Moore e Moore (1994) mais de 500 diferentes *taxa* bacterianas são observados na placa subgengival e, segundo Perea (2004), estima-se que, com a utilização de métodos genéticos, cerca de 700 espécies poderiam compor a microbiota oral. Estudos empregando método de ribotipagem evidenciaram que mais de 100 espécies bacterianas presentes neste biofilme não foram, ainda, cultivadas (TANNER *et al.*, 1994; HARPER-OWEN *et al.*, 1999). Assim, não se pode descartar a possibilidade de que microrganismos ainda não associados à doença periodontal venham a ser reconhecidos como periodontopatógenos (NISHIHARA e KOSEKI, 2004).

Neste estudo, espécime subgengival foi obtido de pelo menos um sítio de cada quadrante da cavidade oral dos pacientes, de preferência daquele que apresentava bolsa periodontal com maior profundidade. Não existe consenso no que se refere à quantidade de sítios que devem ser amostrados para avaliação da microbiota periodontal. Assim, Wahlfors *et al.* (1995) analisaram apenas um sítio, Albandar *et al.* (1997) avaliaram dois

sítios de cada paciente, Slots *et al.* (1995), Ashimoto *et al.* (1996), Riggio *et al.* (1996) e Rams *et al.* (1997) relataram que é necessária a análise de pelo menos três sítios. Para Conrads *et al.* (1996), Van Steenberg *et al.* (1996) e Tran e Rudney (1996, 1999), placa subgengival deve ser coletada de quatro sítios. Já Von Troil-Lindén *et al.* (1995) e Paolantonio *et al.* (2000) avaliaram seis sítios de cada paciente. De acordo com Chen e Slots (1999), o número de espécimes necessário para detecção de um determinado microrganismo varia de acordo com a espécie a ser investigada. Independentemente do número de sítios amostrados, os autores concordam que os sítios mais profundos devem ser analisados.

Além do microrganismo alvo e das medidas clínicas de profundidade da bolsa periodontal, a escolha do sítio a ser amostrado deve considerar o tipo de doença periodontal. Mombelli *et al.* (1991) relataram que quatro espécimes subgengivais, um de cada quadrante, devem ser coletados para a detecção de *P. gingivalis*. Christersson *et al.* (1992) demonstraram que amostragem de pelo menos três bolsas periodontais com, no mínimo, 5mm de profundidade confere probabilidade de 95% de detecção desse microrganismo. Para a detecção de *A. actinomycetemcomitans* em pacientes com periodontite crônica, pode ser requerido um mínimo de 25 espécimes de sítios aleatórios (CHRISTERSSON *et al.*, 1992).

Diversos tipos de espécimes podem ser empregados para detecção de microrganismos associados à doença periodontal, entre eles, amostras obtidas de escovas de dentes (OKADA *et al.*, 2000), saliva estimulada (VON TROIL-LINDÉN *et al.*, 1995), raspado de mucosa oral (LAMELL *et al.*, 2000) e placa dental supragengival e subgengival (FLEMMIG *et al.*, 1995; SLOTS *et al.*, 1995; TRAN e RUDNEY, 1999). No presente estudo, os espécimes clínicos foram obtidos de sulco gengival e de bolsa periodontal.

A colheita de amostras utilizando curetas periodontais (SOCRANSKY *et al.*, 1991; LOESCHE *et al.*, 1992; CONRADS e BRAUNER 1993; LISTGARTEN *et al.*, 1995; VON TROIL-LINDÉN *et al.*, 1995; RIGGIO *et al.*, 1996; TRAN E RUDNEY, 1996; WATANABE e FROMMEL, 1996; TRAN E RUDNEY, 1999) e cones de papel absorvente (FARIAS *et al.*, 1986; GUNSOLLEY *et al.*, 1990; CHRISTERSSON *et al.*,

1992; PREUS *et al.*, 1992; SLOTS *et al.*, 1995; ASHIMOTO *et al.*, 1996; LÓPEZ *et al.*, 1996; ALBANDAR *et al.*, 1997; RAMS *et al.*, 1997; TINOCO *et al.*, 1997; PAOLANTONIO *et al.*, 2000) tem sido descrita por muitos pesquisadores. Moore *et al.* (1985) demonstraram que não houve diferença entre os dois métodos de amostragem. No presente estudo, o material analisado consistiu de *pool* de placa subgengival, obtida com cones de papel e com curetas periodontais, com o objetivo de aumentar a chance de recuperação bacteriana.

Numerosas tentativas de associação entre determinadas bactérias da microbiota oral e *status* periodontal, inclusive de identificação de marcadores de evolução da doença, têm sido realizadas (MAIDEN *et al.*, 1990; DAHLÉN, 1993; PAPAPANOU, 1998). Para detecção dos microrganismos envolvidos, metodologias bacteriológica clássica, imunológica e de genética molecular têm sido empregadas.

Neste estudo, foram utilizadas cultura e PCR, visando avaliar sensibilidade e especificidade dos métodos na detecção de periodontopatógenos putativos.

A cultura é o método mais freqüentemente utilizado como referência para avaliação da eficiência de novas técnicas de detecção de microrganismos. Apesar do desenvolvimento recente de métodos genéticos e imunológicos, a cultura continua sendo importante para a caracterização da microbiota subgengival, especialmente porque permite a análise quantitativa dos principais microrganismos presentes nos espécimes, é o método habitualmente empregado para avaliação, *in vitro*, da susceptibilidade a antimicrobianos dos patógenos periodontais e, após terapia periodontal, pode ser utilizado para avaliação dos níveis de microrganismos viáveis e não de antígenos ou DNA bacteriano, eventualmente, originados de células mortas, incapazes de dar origem ao processo infeccioso (CHEN e SLOTS, 1999).

A PCR é uma técnica de execução rápida, que permite a análise simultânea de um grande número de espécimes. O método apresenta sensibilidade e especificidade elevadas, porém não diferencia organismos viáveis de

inviáveis. A avaliação quantitativa dos microrganismos presentes é possível pelo emprego de uma variação da técnica, denominada *real-time* PCR (TRAN e RUDNEY, 1996; WATANABE e FROMMEL, 1996; CHEN e SLOTS, 1999; TRAN e RUDNEY, 1999; OKADA *et al.*, 2000) que, além de onerosa, não se encontra disponível na maioria dos laboratórios brasileiros.

Os espécimes clínicos foram mantidos em freezer  $-86^{\circ}\text{C}$  até o momento da extração do DNA. Procedimento similar foi utilizado por Conrads *et al.* (1996), Watanabe e Frommel (1996) e Tran e Rudney (1999). No entanto, Wahlfors *et al.* (1995) enfatizaram que, para PCR, as amostras devem ser processadas imediatamente, pois congelamento e descongelamento do material podem levar à diminuição da sensibilidade do método. No presente estudo, as amostras foram descongeladas apenas uma vez, o que minimiza a interferência do procedimento.

*Primers* específicos para detecção de rDNA 16S têm sido amplamente empregados, devido à ocorrência universal do gene nas eubactérias e à existência, na sua estrutura, de seqüências conservadas e hipervariáveis, permitindo a identificação de microrganismos em diferentes níveis taxonômicos (WAHLFORS *et al.*, 1995; CONRADS *et al.*, 1996; TRAN e RUDNEY, 1996; ZAMBON *et al.*, 1996; TRAN e RUDNEY, 1999; OKADA *et al.*, 2000). Além disto, possibilita a detecção de microrganismos não cultiváveis, que não foram, ainda, descritos ou cuja identificação pelo método microbiológico clássico é difícil (ASHIMOTO *et al.*, 1996).

## **6.2 ESTUDO MICROBIOLÓGICO**

### **6.2.1 CULTURA MICROBIOLÓGICA**

A taxa média de isolamento de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro de pacientes com periodontite foi de, aproximadamente,

$10^6$  UFC/ml, tanto no meio de cultura seletivo, como no meio não seletivo. Em relação a *E. corrodens*, a média de crescimento encontrada foi maior nos espécimes obtidos de pacientes com periodontite crônica (cerca de  $10^5$  UFC/ml) que nos de indivíduos com periodonto saudável (cerca de  $10^3$  UFC/ml). Em relação a *F. nucleatum*, a média de crescimento foi semelhante nos espécimes obtidos de pacientes com periodontite crônica e agressiva (cerca de  $10^5$  UFC/ml) (GRÁF. 1, 2 e 3).

Embora meio de cultura seletivo (TSBV) tenha sido empregado para o isolamento de *A. actinomycetemcomitans*, não foi possível avaliar a concentração do microrganismo nos espécimes estudados, já que outras espécies bacterianas, também capazes de se multiplicar neste meio, formam colônias com características macroscópicas semelhantes. A obtenção de cultura pura de *A. actinomycetemcomitans* foi realizada a partir de colônias nas quais a imagem de estrela foi observada ao microscópio. Como a realização deste exame em todas as colônias não era possível, a contagem do número de colônias do microrganismo não foi realizada.

Neste estudo, *E. corrodens* e *F. nucleatum* foram as únicas espécies detectadas por cultura microbiológica nos espécimes obtidos de indivíduos com periodonto saudável e, ainda assim, em concentração inferior àquela encontrada nos pacientes com periodontite.

Dados relatados na literatura demonstram que uma mesma espécie bacteriana pode ser encontrada na placa subgengival de indivíduos com saúde ou com doença periodontal; entretanto, a proporção e os níveis de cada espécie podem ser bastante distintos. No estudo de Lyons *et al.* (2000), empregando técnica de cultivo microbiano, foi observado alto nível de *P. gingivalis* nos espécimes de pacientes com periodontite, quando comparado com aqueles obtidos de indivíduos saudáveis.

Não só a identificação de periodontopatógenos, mas a análise quantitativa destes microrganismos é importante para estabelecimento do diagnóstico, avaliação da terapêutica e de fatores de risco para o desenvolvimento de doença periodontal. Entretanto, poucas técnicas estão disponíveis para



avaliação quantitativa da microbiota subgengival. Acredita-se que diversos componentes da microbiota indígena, principalmente aqueles encontrados em níveis populacionais menores, não estejam relacionadas à etiopatogênese da doença periodontal. Apesar de a contagem de colônias ser o método mais utilizado na análise quantitativa da placa subgengival, esta técnica tem eficiência limitada, devido, entre outros fatores, à complexidade desta microbiota e à presença de microrganismos fastidiosos. Com isso, pode-se obter resultados que demonstram maior número de microrganismos menos exigentes e com crescimento mais rápido que não são, na verdade, membros dominantes da microbiota (NONNENMACHER *et al.*, 2004).

Recentemente, foi proposto um novo método genético, *real-time* PCR, que permite a realização de estudos quantitativos com precisão. A técnica é altamente sensível e específica para a detecção e quantificação de bactérias presentes na placa subgengival (KAWADA *et al.*, 2004; KUBONIWA *et al.*, 2004; NONNENMACHER *et al.*, 2004; SUZUKI *et al.*, 2004). Além disto, dispensa a realização de eletroforese para detecção dos produtos amplificados.

Neste estudo, *T. forsythensis* e *T. denticola* não foram analisados por cultura microbiológica. Problemas no cultivo de *T. forsythensis* são relatados em vários estudos, que sugerem a imprecisão desta técnica, por se tratar de um microrganismo anaeróbio obrigatório fastidioso (LOESCHE *et al.*, 1992; LISTGARTEN *et al.*, 1995; ALI *et al.*, 1996; TANNER *et al.*, 1998) e de caracterização bioquímico-fisiológica muito difícil (TANNER *et al.*, 1979; DZINK *et al.*, 1985). Apesar de ser considerado de difícil crescimento, Wyss (1989) e Braham e Moncla (1992) descreveram métodos para cultivo desta espécie bacteriana, utilizando meios de cultura suplementados com ácido N-acetilmurâmico. Outro fator limitante encontrado, nesse estudo, foi a ausência de características morfocoloniais específicas que permitissem sua seleção para a obtenção de cultura pura. Em relação aos treponemas orais, sete espécies têm sido cultivadas e classificadas, incluindo *T. denticola* (DEWHRIST *et al.*, 2000). Entretanto, estes microrganismos são de

crescimento fastidioso, com exigências nutricionais complexas e com marcada sensibilidade à inibição do crescimento (WYSS *et al.*, 1996). Meios de cultivo contendo antimicrobianos têm sido propostos para o isolamento destes treponemas; entretanto dados da literatura mostraram que algumas linhagens podem ser sensíveis a polimixina e ácido nalidíxico, antimicrobianos comumente utilizados nestes meios seletivos (UMEDA *et al.*, 1990; QIU *et al.*, 1994).

Investigando a prevalência de periodontopatógenos putativos, por cultura microbiológica, pôde-se, neste estudo, demonstrar associação estatisticamente significativa entre *P. intermedia/nigrescens*, *F. nucleatum* e *F. varium* e periodontite crônica (TAB. 2).

*P. intermedia/nigrescens* foi recuperada de 63,3% dos pacientes com periodontite crônica, como mostrado na tabela 1, resultado semelhante àquele descrito por Ali *et al.* (1996) que, avaliando pacientes com a mesma condição clínica e empregando metodologia semelhante, isolaram *P. intermedia* de 54,5% dos pacientes analisados. Nos estudos de Nonnenmacher *et al.* (2001), *P. intermedia* foi a espécie bacteriana recuperada mais freqüentemente, constituindo 10,2% das espécies bacterianas isoladas dos pacientes com periodontite do adulto. Dentre as espécies bacterianas recuperadas por Dogan *et al.* (2003) de sítios periodontais de pacientes com periodontite crônica, *P. intermedia/nigrescens* estava presente em, aproximadamente, 85% dos espécimes, sendo recuperada com freqüência maior do que a obtida neste estudo.

*P. gingivalis* é um dos microrganismos mais fortemente associados à periodontite do adulto e parece desempenhar papel importante também em outras formas de periodontite (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1988). Entretanto, neste estudo, *Porphyromonas* spp. foi recuperada de apenas 10,0% dos espécimes obtidos dos pacientes com periodontite crônica (TAB. 1). Baixa porcentagem deste patógeno periodontal foi também observada em outros estudos que empregaram métodos de cultura convencionais. Rodenburg *et al.* (1990) detectaram esta espécie em cerca de 8% dos pacientes, Riggio *et*

*al.* (1996) em aproximadamente 11%, Conti *et al.* (1998) em 12,0% e Nonnenmacher *et al.* (2001) em 6,4%. Entretanto, outros dados da literatura descrevem uma taxa de recuperação desta espécie bem maior do que o encontrado. *P. gingivalis* foi detectada por Slots *et al.* (1986) em 41,5% dos sítios ativos analisados, por Slots (1986) em 48,0%, por Dzink *et al.* (1988) em 22,0%, por Moore *et al.* (1991) em 50,0%, por Ali *et al.* (1996) em 75,8%, por Yano-Higuchi *et al.* (2000) em 64,3%, por López (2000) em 75,0% e por Dogan *et al.* (2003) em 70,0%.

*F. nucleatum* foi isolada de 73,3% dos espécimes, sendo uma das espécies bacterianas associadas à periodontite crônica neste estudo (TAB. 1). Resultados semelhantes foram apresentados por Papapanou *et al.* (1997) que, empregando cultura microbiológica, encontraram esta espécie bacteriana em cerca de 68% dos indivíduos sudaneses com periodontite do adulto e em 100% dos espécimes obtidos de pacientes noruegueses com as mesmas condições periodontais. Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002), analisando uma população brasileira com periodontite do adulto, detectaram esta espécie bacteriana em 90,0% dos pacientes; entretanto, *F. nucleatum* não pôde ser associado a este quadro clínico de doença periodontal, pois estava presente, também, com freqüência elevada, nos indivíduos com periodonto saudável (84,0%). Ali *et al.* (1996), utilizando metodologia semelhante, detectaram *F. nucleatum* com freqüência menor do que a observada neste estudo, sendo recuperado de 52,8% dos pacientes com periodontite do adulto.

Não foi demonstrada relação entre *A. actinomycetemcomitans* e periodontite crônica, tendo este microrganismo sido isolado, por cultura microbiológica, de 10,0% dos espécimes analisados (TAB. 1). A baixa freqüência de detecção desta espécie bacteriana em pacientes adultos, utilizando esta metodologia, tem sido descrita na literatura. Yano-Higuchi *et al.* (2000) e Nonnenmacher *et al.* (2001) recuperaram este microrganismo de 9,0% e 4,8% dos espécimes avaliados, respectivamente. Entretanto, dados contrastantes foram apresentados por Ali *et al.* (1996) e por Dogan

*et al.* (2003), que detectaram *A. actinomycetemcomitans* em, aproximadamente, 40% dos pacientes com este quadro periodontal.

Em relação aos microrganismos envolvidos na periodontite agressiva, pôde-se observar, com o método de cultivo, a associação de *P. intermedia/nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans* com esta doença periodontal (TAB. 1).

A ocorrência de *P. intermedia/nigrescens* nos pacientes com periodontite agressiva, neste estudo, foi de 80,0%, como apresentado na tabela 1. Esses dados foram semelhantes aos apresentados por Kuru *et al.* (1999) e Kamma *et al.* (2004), que detectaram esses microrganismos em indivíduos com a mesma condição periodontal, utilizando cultura microbiológica, em 80,0% e 85,9% dos sítios avaliados, respectivamente.

*Porphyromonas* spp. foi identificada em 10,0% dos indivíduos analisados neste estudo (TAB.1). Em contraste, *P. gingivalis* foi recuperada por Kuru *et al.* (1999) de 93,3% dos pacientes avaliados e por Kamma *et al.* (2004) de 89,4%. Dogan *et al.* (2003), utilizando cultura microbiológica, detectaram *P. gingivalis* em cerca de 39% dos pacientes com periodontite agressiva localizada e em, aproximadamente, 52% dos pacientes com periodontite agressiva generalizada.

Outra espécie bacteriana freqüentemente isolada, *F. nucleatum*, foi detectada em 33,3% da população estudada (TAB. 1). Diferentemente destes dados, Kuru *et al.* (1999) e Kamma *et al.* (2004) encontraram uma maior freqüência de recuperação, 76,7% e 72,7%, respectivamente.

Dados obtidos neste estudo demonstram a ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* em 26,7% dos pacientes com periodontite agressiva (TAB. 1), confirmando dados da literatura, que consideram esta espécie bacteriana o principal patógeno associado a esta manifestação periodontal (LISTGARTEN *et al.*, 1981; MANDELL e SOCRANSKY, 1981; SAGLIE *et al.*, 1982; ZAMBON *et al.*, 1983; SLOTS e GENCO, 1984; GUNSOLLEY *et al.*, 1990; WILSON e HENDERSON, 1995; ZAMBON, 1996; ALBANDAR *et al.*, 1997; SLOTS e TING, 1999; GRENIER e MAYRAND, 2000; PAOLANTONIO *et al.*, 2000).

Dados nacionais indicam existência de associação desta espécie bacteriana à periodontite que acomete indivíduos jovens (FARIAS *et al.*, 1986; ÁVILA-CAMPOS *et al.*, 1991; LIMA, 1997; TINOCO *et al.*, 1997; MASSARA, 2001). Prevalência maior de *A. actinomycetemcomitans* que a observada no presente estudo foi relatada por Tinoco *et al.* (1997). Os autores observaram que 80,0% dos pacientes albergavam este microrganismo nos sítios periodontais analisados, demonstrando, assim, uma forte associação desta espécie com a doença periodontal em pacientes adultos jovens.

Alguns estudos demonstram ocorrência de *A. actinomycetemcomitans* em números baixos ou mesmo ausência do microrganismo em indivíduos com periodontite agressiva (LOESCHE *et al.*, 1985; HAN *et al.*, 1991).

Slots *et al.* (1990) observaram que a maioria dos pacientes com doença periodontal com idade até 24 anos abrigava *A. actinomycetemcomitans* nas bolsas periodontais; entretanto, para os autores, a ocorrência desta espécie bacteriana decresce significativamente com a idade. Neste estudo, como a média de idade dos pacientes com periodontite agressiva foi de 26 anos, a frequência de indivíduos *A. actinomycetemcomitans* positivos deveria ser menor. Kamma *et al.* (2004) também sugerem que a baixa frequência de isolamento de *A. actinomycetemcomitans* (25,0% dos pacientes) em seu estudo poderia ser explicada pela idade média mais elevada dos indivíduos analisados (31 anos). Segundo Asikainen e Chen (1999), nesta situação, poderia ser observado um aumento no número de bolsas periodontais colonizadas por *P. gingivalis*.

Embora esteja bem estabelecida a existência de associação entre *A. actinomycetemcomitans* e a periodontite que acomete pacientes jovens, outros microrganismos são frequentemente isolados de sítios com destruição periodontal, como *P. intermedia*, *C. rectus*, *F. nucleatum* e espiroquetas (MOORE *et al.*, 1985). Tolo e Schenck (1985) também observaram que *P. gingivalis* e *P. intermedia* podem ser responsáveis por induzir resposta imunológica no hospedeiro, em pacientes com periodontite juvenil localizada, demonstrando, assim, que estas espécies bacterianas

também desempenham papel importante na patogênese dessas doenças periodontais.

Existem alguns relatos referentes a estudos que empregaram métodos de cultivo para o isolamento de *T. forsythensis* de espécimes clínicos obtidos de pacientes com periodontite de início precoce. Seida *et al.* (1992) e Kamma *et al.* (1994) obtiveram freqüências de recuperação acima de 53% e Kamma *et al.* (2004) relataram prevalência de *T. forsythia* em 98,5% dos sítios periodontais estudados.

Embora patógenos periodontais sejam recuperados de sulcos gengivais sem inflamação, neste estudo, bastonetes produtores de pigmento negro e *A. actinomycetemcomitans* não foram isolados de sítios periodontais saudáveis (TAB. 1). Segundo Ximénez-Fyvie *et al.* (2000), microrganismos patogênicos como *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *C. rectus* e *P. intermedia* podem estar presentes no sulco gengival, porém em proporções menores que em bolsas periodontais.

Em estudos de Savitt e Socransky (1984), *E. corrodens* foi isolada de, aproximadamente, 10% dos espécimes de placa subgengival de sítios sem sinais de doença. Esses dados foram corroborados por Chen e Wilson (1992), que consideraram esta espécie componente da microbiota oral indígena, sendo sua ocorrência na placa subgengival compatível com periodonto saudável, mas podendo desempenhar papel importante em certas formas clínicas de periodontite.

Este estudo comparou a eficiência do sistema de identificação Rapid ID 32 A e de testes bioquímicos convencionais para a identificação de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro. Vários sistemas de identificação para bactérias anaeróbias isoladas de espécimes clínicos encontram-se disponíveis no mercado. Os sistemas comerciais originais baseiam-se em testes bioquímico-fisiológicos, exigindo incubação por 24-48 horas, em condições de anaerobiose. Mais recentemente, foram desenvolvidos sistemas de identificação que empregam substratos cromogênicos para detecção de enzimas bacterianas pré-formadas, entre eles os *kits* Rapid ID

Ana, Ana-Ident e Rapid ID 32 A. Estes sistemas permitem a obtenção do resultado após apenas 4 horas de incubação, em atmosfera de aerobiose. Permitem também a identificação de bactérias assacarolíticas, geralmente, não reativas em testes bioquímicos convencionais (DOWNES *et al.*, 1999).

Neste estudo, foram observadas discrepâncias, especialmente na identificação de *Porphyromonas* spp. Cerca de 67% das amostras caracterizadas como *Porphyromonas* spp. por meio de testes bioquímicos convencionais foram identificadas como *Prevotella* spp. pelo sistema Rapid ID 32 A, embora *Porphyromonas* e *Prevotella* sejam considerados gêneros bacterianos essencialmente assacarolítico e sacarolítico, respectivamente. Observou-se, neste estudo, dificuldade de leitura dos resultados relativos à habilidade de fermentação de carboidratos obtidos por testes bioquímicos convencionais. Para que uma amostra fosse considerada não fermentadora, o valor de pH da cultura, após incubação, deveria ser maior que 5,9 (SUMMANEN *et al.*, 1993). Assim, as amostras bacterianas que produzissem quantidade de ácido insuficiente para reduzir o pH a esse valor seriam consideradas não fermentadoras. Caso o teste de fermentação de carboidratos fosse o único teste discriminatório, as amostras bacterianas poderiam ser identificadas incorretamente. Por este motivo, o sistema Rapid ID 32 A foi utilizado como teste microbiológico complementar e definitivo para a identificação das bactérias anaeróbias isoladas.

Ainda assim, não foi possível a identificação das amostras de *Porphyromonas*, no nível de espécie, por qualquer dos sistemas microbiológicos empregados. Nos estudos de Downes *et al.* (1999), cerca de 33% das amostras de *Porphyromonas*, avaliadas pelo Rapid ID 32 A, também só puderam ser identificadas no nível de gênero. Os sistemas comerciais diferenciam grupos taxonômicos com base em perfis enzimáticos característicos de cada espécie. Entretanto, várias espécies podem apresentar perfil enzimático semelhante, o que resulta em baixo poder discriminatório do teste e, conseqüentemente, compromete sua eficiência.

Estudos anteriores, avaliando a identificação de bastonetes Gram negativos anaeróbios, excluindo *Bacteroides* do grupo *B. fragilis*, por sistemas de

identificação comerciais, demonstraram a eficiência do método para a distinção desse grupo microbiano. Kitch e Appelbaum (1989), Looney *et al.* (1990), Pattyn *et al.* (1993), Arzese *et al.* (1994) e Downes *et al.* (1999) identificaram, no nível de espécie, cerca de 88%, 98%, 97%, 90% e 82% dos isolados analisados, respectivamente, empregando kits de identificação e testes adicionais.

Looney *et al.* (1990) apontaram, como vantagens dos sistemas comerciais de identificação de bactérias anaeróbias, baseados no perfil de enzimas pré-formadas, o fato de que não há necessidade de multiplicação das amostras, o que permite a obtenção dos resultados em um curto período de tempo e dispensa incubação em atmosfera de anaerobiose. Além disto, quando necessários, os testes adicionais para a identificação pelo sistema ATB 32 A da maioria das bactérias comumente encontradas em espécimes clínicos, são, geralmente, simples, como o exame microscópico de esfregaços e provas complementares bioquímico-fisiológicas.

### 6.2.2 ESTUDO GENÉTICO

Neste estudo, a frequência de *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* não pode ser avaliada por PCR, uma vez que, embora diversos protocolos, modificados ou não, tenham sido testados, a sensibilidade e a especificidade das reações utilizadas não se mostraram adequadas.

Todas as espécies bacterianas analisadas por metodologia genética estavam associadas à periodontite crônica (TAB. 4). As espécies mais frequentemente detectadas foram *T. denticola*, *F. nucleatum* e *E. corrodens* (acima de 90%) (TAB. 3).

Taxas de detecção de *T. denticola* semelhantes às observadas neste estudo têm sido descritas. Söder *et al.* (1993) relataram que o microrganismo foi observado em todos os pacientes avaliados. Papapanou *et al.* (1997)



observaram que esta espécie estava presente em 97,9% dos pacientes com periodontite crônica. Outros pesquisadores relataram taxas de detecção de *T. denticola* menores. Ali *et al.* (1997) encontraram uma frequência de isolamento de 66,7% desta espécie bacteriana. Avaliando pacientes brasileiros, Colombo *et al.* (2002), Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002) observaram que este microrganismo estava presente em, aproximadamente, 20% e 50% dos pacientes avaliados, respectivamente.

No que se refere à ocorrência de *F. nucleatum*, Papapanou *et al.* (1997) detectaram o microrganismo em todos os pacientes com periodontite crônica analisados. De forma semelhante, Ali *et al.* (1997) e Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002) detectaram esta espécie bacteriana em cerca de 96% e 86% dos espécimes obtidos, respectivamente.

A presença de *T. forsythensis* foi detectada por hibridização DNA-DNA em cerca de 57% dos pacientes com periodontite do adulto (ALI *et al.*, 1994; LOTUFO *et al.*, 1994; LISTGARTEN *et al.*, 1995). Ali *et al.* (1997) e Papapanou *et al.* (1997) avaliaram, também, a presença desta espécie em pacientes com a mesma manifestação periodontal, utilizando a técnica *checkerboard*. As frequências de detecção foram de 81,5% (Ali *et al.*, 1997) e 98,6% (Papapanou *et al.*, 1997), semelhantes às observadas neste estudo. Yano-Higuchi *et al.* (2000), utilizando PCR, observaram que 78,6% dos espécimes obtidos de pacientes com este tipo de periodontite albergavam esta espécie bacteriana.

Apesar de *E. corrodens* ser uma espécie bacteriana mais relacionada às formas agressivas de periodontite (DZINK *et al.*, 1985; TANNER *et al.*, 1987), os resultados alcançados no presente estudo, quando se utilizou PCR, mostraram relação entre *E. corrodens* e periodontite crônica. Semelhantemente, Söder *et al.* (1993) também sugeriram esta associação; os autores demonstraram a presença de *E. corrodens* em todos os pacientes estudados, empregando sondas de DNA para avaliação da presença do microrganismo na placa subgengival de pacientes adultos com periodontite. Contudo, a interpretação fica, até certo ponto, prejudicada pela ausência de dados quanto aos indivíduos saudáveis. Ávila-Campos e Velásquez-

Meléndez (2002), empregando PCR, relataram que *E. corrodens* foi detectada mais freqüentemente em pacientes com periodontite crônica (80,0%) que em indivíduos com periodonto saudável (50,0%). Menor número de pacientes com periodontite crônica que albergavam *E. corrodens* nas bolsas periodontais foi observado por Colombo *et al.* (2002). Estes autores, empregando a técnica *checkerboard*, detectaram a espécie em cerca de 50% dos pacientes com periodontite e em, aproximadamente, 40% dos indivíduos com periodonto saudável.

Com relação à associação entre *P. intermedia/nigrescens* e periodontite crônica, os resultados obtidos neste estudo, com a utilização de métodos genéticos, corroboram os dados da literatura (FUKUI *et al.*, 1999; LÓPEZ, 2000; ÁVILA-CAMPOS e VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2002). *P. intermedia* parece estar associada à periodontite avançada, enquanto *P. nigrescens* colonizaria sítios subgingivais saudáveis, principalmente de crianças (GHARBIA *et al.*, 1994). O presente estudo, contudo, demonstrou que tanto *P. intermedia* como *P. nigrescens* poderiam estar associadas à periodontite crônica, fato também observado por Fukui *et al.* (1999).

Söder *et al.* (1993) detectaram, por hibridização DNA-DNA, a presença de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans* em cerca de 95% e 75% dos indivíduos com periodontite do adulto avaliados, respectivamente. Ali *et al.* (1997), utilizando a técnica *checkerboard*, encontraram *P. gingivalis* em 85,7% e *A. actinomycetemcomitans* em 52,3% dos pacientes analisados. Utilizando sonda de DNA, López (2000) observou a presença de *P. gingivalis* em 96,0% e *A. actinomycetemcomitans* em 11,6% dos pacientes. No estudo de Yano-Higuchi *et al.* (2000), *P. gingivalis* estava presente em 58,3% e *A. actinomycetemcomitans* em 1,2% dos 84 espécimes obtidos de 21 pacientes com periodontite crônica. Dogan *et al.* (2003) detectaram, por PCR, *P. gingivalis* em 93,0% e *A. actinomycetemcomitans* em 50,0% dos pacientes com periodontite crônica. Takeuchi *et al.* (2003) relataram que *A. actinomycetemcomitans* foi recuperado em níveis relativamente baixos de uma população japonesa com periodontite crônica (8,6%).

Considerando-se os resultados obtidos por PCR, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum*, *T. forsythensis* e *T. denticola* estavam estatisticamente associados com periodontite agressiva (TAB. 4).

Albandar *et al.* (1997), estudando um grupo de 148 pacientes com periodontite de início precoce, detectaram *P. intermedia*, utilizando sonda de DNA, em 82,4% dos pacientes avaliados. Darby *et al.* (2000), empregando PCR, encontraram o microrganismo em 79,2% dos indivíduos com esta mesma condição periodontal. Já Mullally *et al.* (2000) detectaram, também por PCR, a presença de *P. intermedia* em 58,8% dos pacientes com periodontite agressiva. Em relação a *P. nigrescens*, os autores observaram que 64,3% dos pacientes albergavam esta espécie, dados semelhantes aos observados neste estudo.

Mullally *et al.* (2000), empregando PCR, detectaram *T. denticola*, *T. forsythensis*, *P. nigrescens*, *E. corrodens*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* na placa subgengival de, respectivamente, 88,1%, 78,6%, 64,3%, 42,9%, 40,5%, 19,0% e 16,7% dos indivíduos com periodontite de início precoce. Exceto para *T. denticola*, os resultados do presente estudo foram diferentes daqueles relatados por estes autores.

Takeuchi *et al.* (2003), utilizando PCR, observaram freqüência elevada de detecção de *T. forsythensis* e *T. denticola* nos pacientes com periodontite agressiva, dados semelhantes aos obtidos neste estudo. Além destes microrganismos, *C. rectus* e *P. gingivalis* foram detectados freqüentemente na placa subgengival dos pacientes com periodontite agressiva. Miura *et al.* (2005), também empregando PCR, relacionaram *T. forsythensis* à periodontite agressiva. Entretanto, estes autores detectaram esta espécie bacteriana com freqüência mais elevada (91,9%) do que a obtida neste estudo (63,3%) (TAB. 3).

Para Albandar *et al.* (1997), *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *C. rectus* e *T. denticola* são microrganismos envolvidos na periodontite de

início precoce, já que foram detectados, por sonda de DNA, em níveis mais elevados em sítios com lesões características da doença. Diferentemente da maioria dos relatos apresentados na literatura, estes autores não observaram associação entre *A. actinomycetemcomitans* e esta forma de doença.

Takeuchi *et al.* (2003) descreveram que *A. actinomycetemcomitans* foi detectado, por PCR, em níveis relativamente baixos em uma população japonesa com periodontite agressiva localizada (20,0%) e generalizada (17,5%), não sendo observada diferença estatisticamente significativa entre a forma agressiva da doença e periodontite crônica (8,6%) no que se refere à frequência de detecção do microrganismo. Miura *et al.* (2005), empregando PCR para detecção de *A. actinomycetemcomitans*, observaram diferença estatisticamente significativa quando pacientes com periodontite agressiva foram comparados com indivíduos com periodonto saudável; esta espécie estava presente em 34,1% dos pacientes com doença e em somente 6,3% dos indivíduos com sítios periodontais saudáveis.

*Fusobacterium* spp., *E. corrodens*, *T. forsythensis* e *T. denticola* foram detectados em 7,14%, 66,7%, 13,3% e 26,7% dos indivíduos com periodonto saudável incluídos neste estudo, respectivamente.

Freqüências maiores de detecção de *Fusobacterium* spp. em indivíduos sem doença periodontal têm sido relatadas. Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002) detectaram, por PCR, *F. nucleatum* em 92,0% dos indivíduos. Colombo *et al.* (2002), utilizando *checkerboard*, observaram a espécie em 40,0% dos espécimes analisados.

Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002), empregando PCR, e Colombo *et al.* (2002), utilizando *checkerboard*, detectaram *E. corrodens* em cerca de 50% e de 38% dos indivíduos com periodonto saudável, respectivamente.

Estudando a ocorrência de periodontopatógenos, por PCR, na saliva de indivíduos sem doença periodontal, Sirinian *et al.* (2002) detectaram *T. denticola* em, aproximadamente, 18% dos sítios avaliados, *A.*

*actinomyetemcomitans* e *P. gingivalis* em cerca de 15% e *T. forsythensis* em cerca de 14%. Miura *et al.* (2005), utilizando o mesmo método genético, detectaram *A. actinomyetemcomitans*, *P. gingivalis* e *T. forsythensis* em 6,3%, 16,8% e 16,8% dos indivíduos com periodonto saudável, respectivamente. Dados semelhantes foram obtidos neste estudo em relação à detecção de *T. denticola* e *T. forsythensis* em indivíduos com saúde periodontal (26,7% e 13,3%, respectivamente) (TAB. 3).

Sirinian *et al.* (2002) avaliaram também a distribuição desses patógenos em indivíduos de diferentes etnias, habitantes da mesma região geográfica, e concluíram que as divergências encontradas se deviam, principalmente, a fatores comportamentais, como nível educacional e número de visitas ao dentista, e não a fatores raciais.

Neste estudo, com a utilização da PCR, *P. intermedia* e *P. nigrescens* não foram detectadas nos espécimes obtidos de indivíduos com periodonto saudável. Diferentemente, Kuboniwa *et al.* (2004) detectaram, também empregando PCR, *P. intermedia* e *P. nigrescens* na placa subgengival de 50% e 100% dos indivíduos com a mesma condição periodontal, respectivamente. Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002), por PCR, e Colombo *et al.* (2002), por *checkerboard*, detectaram *P. intermedia* em cerca de 64% e de 25% dos indivíduos analisados, respectivamente.

Okada *et al.* (2000), utilizando PCR para avaliação da ocorrência de *A. actinomyetemcomitans* e *P. gingivalis* na placa dental de crianças, detectaram estes microrganismos em 4,8% dos espécimes obtidos de indivíduos com periodonto saudável e em 20,0% dos sítios com periodontite, mostrando que estes patógenos estão raramente presentes na cavidade oral de crianças sem doença periodontal. Conrads *et al.* (1996), utilizando PCR, não detectaram a presença de *A. actinomyetemcomitans* e *P. gingivalis* em sítios saudáveis. Os autores sugeriram que esses patógenos periodontais podem não ser componentes da microbiota indígena em condições de saúde.

Os níveis de microrganismos presentes nos espécimes subgengivais obtidos de pacientes com periodontite eram maiores que os observados em indivíduos com periodonto saudável, quando diluições seriadas do DNA extraído foram empregadas. Pouca diferença foi observada quando os grupos com periodontite agressiva e com periodontite crônica foram comparados (TAB. 4, 5 e 6). Apesar das limitações desta avaliação, como a impossibilidade de controle da quantidade de material obtido de cada indivíduo e da perda de DNA durante o processo de extração, os dados sugerem que os espécimes obtidos de pacientes com doença periodontal apresentam um número maior de cada periodontopatógeno. Este fato concorda com os relatos da literatura que descrevem que a instalação da doença periodontal está relacionada ao crescimento da população de determinados grupos microbianos (DARVEAU *et al.*, 1997; SOCRANSY e HAFFAJEE, 1999). Resultados obtidos por *real-time* PCR, técnica que permite análise quantitativa da microbiota, demonstram que a placa subgengival de pacientes com doença periodontal alberga número maior de determinadas espécies bacterianas do que a de indivíduos com periodonto saudável.

Nonnenmacher *et al.* (2004), utilizando *real-time* PCR, demonstraram que *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *Dialister pneumosintes* e *M. micros* estão presentes em bolsas periodontais de pacientes com periodontite em concentrações mais altas do que no sulco gengival de pacientes com periodonto saudável. Kuboniwa *et al.* (2004), com emprego da mesma metodologia, quantificaram seis periodontopatógenos (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*) na placa subgengival e em *debris* obtidos da superfície da língua de pacientes com e sem doença periodontal. Todas as espécies com exceção de *P. nigrescens* foram detectadas em números mais altos nos pacientes com doença periodontal.

### 6.2.3 RELAÇÃO ENTRE GRUPOS BACTERIANOS E STATUS PERIODONTAL

*P. intermedia/nigrescens* foi recuperada com freqüência elevada dos pacientes com periodontite crônica e agressiva e não foi isolada de indivíduos com periodonto saudável, independentemente do método utilizado neste estudo (TAB. 1 e 3). Segundo Mayrand e Holt (1988) e Dahlén (1993), bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro são constituintes da microbiota oral de seres humanos, sendo encontrados em sítios saudáveis ou com doença, geralmente participando de infecções polimicrobianas, diferentemente dos dados obtidos neste estudo. Entretanto, é aceito pela maioria que estes microrganismos apresentam-se em número aumentado em um sítio periodontal, quando se reconhece atividade de doença (DAHLÉN, 1993).

A alta freqüência de *P. intermedia lato sensu* encontrada é similar ao resultado de outros estudos (SLOTS e LITSGARDEN, 1988, DAHLÉN *et al.*, 1989; DAHLÉN *et al.*, 1992; DAHLÉN, 1993; MAEDA *et al.*, 1998, RODRIGUES *et al.*, 1999). López (2000) relata, ainda, que *P. intermedia*, assim como *P. gingivalis*, seria um dos patógenos associados à periodontite que acomete indivíduos adultos.

No Brasil, são raros os estudos que avaliam a freqüência de isolamento de bastonetes produtores de pigmento negro nos indivíduos com ou sem doença periodontal. Um dos primeiros estudos foi realizado por Carvalho (1975) que isolou e caracterizou amostras de *Bacteroides melaninogenicus* recuperados de placa subgengival e, já nesta época, foi observada grande diversidade, no que se refere ao comportamento bioquímico, neste grupo bacteriano. A freqüência de recuperação de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro foi muito menor que aquela obtida neste trabalho; entretanto, naquele estudo atmosfera de anaerobiose foi obtida por método mecânico (jarra tipo *Brewer*, com mistura gasosa de CO<sub>2</sub> 10,0% e N<sub>2</sub> 90,0%), menos eficiente que o método empregado neste estudo (câmara anaeróbica). A diversidade do grupo dos bastonetes anaeróbios

produtores de pigmento negro demonstrada naquele estudo foi confirmada pelas mudanças na taxonomia destes microrganismos, mas as diferenças nas metodologias empregadas dificultam a comparação dos resultados encontrados.

Com o emprego de PCR, *P. nigrescens* foi detectada mais freqüentemente, tanto nos pacientes com periodontite crônica como nos com a forma agressiva da doença, que *P. intermedia* (TAB. 3). Diferente destes resultados, Gharbia *et al.* (1994) e Mättö *et al.* (1996) concluíram, em seus estudos, que *P. intermedia* parece ser mais estável em sítios com doença periodontal e *P. nigrescens* mais relacionada à placa dental presente no sulco gengival. Maeda *et al.* (1998) relataram que *P. nigrescens* seria a principal espécie do grupo dos bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro associada a sítios com periodonto saudável, enquanto *P. intermedia* estaria presente em sítios com e sem doença periodontal. Teanpaisan *et al.* (1995) observaram que a incidência de *P. intermedia* é semelhante em sítios com saúde e com doença periodontal e que *P. nigrescens* pode também ser detectada com a mesma freqüência. Na maioria dos artigos, não há distinção entre *P. intermedia* e *P. nigrescens*. Entretanto, como demonstrado por Conrads *et al.* (1996), *P. nigrescens* poderia ser considerada um marcador de condições periodontais saudáveis, enquanto *P. intermedia* seria recuperada de sítios com doença periodontal, dado que não foi confirmado neste estudo, embora *P. nigrescens* tenha sido detectada com maior freqüência nos pacientes com periodontite que *P. intermedia*.

Dentre os periodontopatógenos avaliados, *Fusobacterium* spp. foi um dos grupos microbianos detectados com maior freqüência em pacientes com periodontite (TAB. 1 e 3). Embora seja potencialmente patogênico, o papel deste grupo na etiopatogenia das doenças periodontais ainda é questionado (LOESCHE, 1992; SHELBURNE *et al.*, 1993). Segundo Haffajee e Socransky (1994), a associação de *F. nucleatum* com outras espécies bacterianas, como *T. forsythensis* e *P. gingivalis*, seria um fator determinante na



transição entre saúde e doença, estando *F. nucleatum* possivelmente envolvido na alteração dos níveis de inserção epitelial na lesão periodontal.

Alguns resultados obtidos neste estudo em relação à frequência de detecção de certos microrganismos, diferem daqueles apresentados na literatura. Segundo Dahlén (1993), técnicas de amostragem, transporte e isolamento podem influenciar na recuperação de bactérias anaeróbias obrigatórias que, por serem mais sensíveis, podem ser subestimadas. A idade dos pacientes avaliados, bem como a etnia e o grau de atividade da doença no sítio amostrado também podem interferir diretamente nos dados encontrados (MOMBELLI *et al.*, 1990).

Fatores raciais e ambientais parecem influenciar a prevalência de *P. gingivalis*, *T. forsythensis* e *T. denticola* (MURRO *et al.*, 1997). Apesar de as investigações atuais indicarem uma forte relação entre estas bactérias e a forma crônica da doença periodontal, os dados apresentados não devem ser interpretados como indicadores de que estas espécies são as únicas a contribuir para a patogênese da periodontite crônica. Indivíduos com esta forma da doença podem não apresentar, ou apresentar um número muito baixo desta espécie no sítio lesado ou, até mesmo, albergar outras espécies fortemente implicadas (SLOTS *et al.*, 1990).

#### 6.2.4 COMPARAÇÃO ENTRE RESULTADOS DOS MÉTODOS MICROBIOLÓGICO CLÁSSICO E GENÉTICO

Para que os resultados obtidos pelos diferentes métodos empregados pudessem ser comparados, considerou-se *Fusobacterium* spp., conforme identificação por PCR, como *F. nucleatum*, mesmo sabendo que o protocolo utilizado detecta duas outras espécies relacionadas (*F. periodonticum* e *F. mortiferum*), uma vez que *F. nucleatum* é, entre as espécies do gênero, a predominante nos sítios subgengivais e *F. mortiferum* ou *F. periodonticum*

são raramente isolados de espécimes periodontais (SLOTS e RAMS, 1990; HAFFAJEE e SOCRANSKY, 1994; PASTER *et al.*, 2001).

Um dos objetivos deste estudo foi comparar PCR e cultura microbiológica para detecção de alguns periodontopatógenos putativos. Como mostram os quadros 4, 5, 6, 7 e 8, independentemente do grupo de indivíduos avaliados, com ou sem manifestação clínica de doença periodontal, houve correspondência entre os dados obtidos por PCR e cultura quanto à detecção de *P. intermedia/nigrescens* em 82,0% dos espécimes, *F. nucleatum* em 63,4% e *E. corrodens* em 25,9%.

Os dados discrepantes são, principalmente, resultados positivos obtidos por PCR e negativos quando se empregou a cultura microbiológica indicando maior sensibilidade do método genético para detecção da maioria destes microrganismos em espécimes clínicos, especialmente *E. corrodens*. Somente *F. nucleatum* foi detectado com maior frequência, por cultura microbiológica que por PCR, em espécimes obtidos de indivíduos sem manifestação clínica de doença periodontal.

Loesche *et al.* (1992) compararam cultura microbiológica com hibridização DNA-DNA para detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em amostras de placa subgengival obtidas de bolsas periodontais e observaram maior nível de detecção destes microrganismos quando a metodologia genética foi empregada. Os autores concluíram que técnicas de cultivo subestimam a presença destas espécies bacterianas. Porém, ressaltaram que a possibilidade de obtenção de resultado falso positivo com a utilização de métodos genéticos não pode ser excluída. Além disso, estes métodos permitem a detecção de células microbianas inviáveis, que não poderiam ser cultivadas e não teriam importância direta na doença.

Van Steenberg *et al.* (1996) também compararam a eficácia das técnicas de hibridização DNA-DNA e de cultura microbiológica para detecção de amostras bacterianas presentes em bolsas periodontais. Os autores analisaram espécimes clínicos e culturas pura e mista de espécies bacterianas relacionadas à doença periodontal. A especificidade do método

genético para detecção de *P. gingivalis* nos espécimes clínicos foi considerada baixa (52,0%), quando comparada com aquela da cultura bacteriana (82,0%). Os autores relataram também resultados positivos quando empregaram metodologia genética e negativos quando a cultura foi utilizada, o que poderia ser explicado pela ocorrência de hibridização inespecífica, levando a resultados falso positivos, ou mesmo a uma maior sensibilidade deste método, quando comparado à cultura.

Os dados obtidos por Riggio *et al.* (1996) também indicaram maior sensibilidade da PCR quando comparada com o método de cultura para detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* em placa subgingival de pacientes com doença periodontal. Somente dois espécimes avaliados pelos autores apresentaram resultado positivo por cultura e negativo por PCR. É possível que algumas amostras de *P. gingivalis* e de *A. actinomycetemcomitans* apresentem alterações na seqüência de nucleotídeos da região a ser amplificada, o que impediria o anelamento dos *primers* empregados e, conseqüentemente, a amplificação da seqüência alvo.

Ashimoto *et al.* (1996), comparando cultura microbiológica e PCR para detecção de patógenos periodontais putativos, mostraram maior eficiência do método genético. Para a detecção de *T. forsythensis* os autores observaram dados concordantes entre cultura e PCR em 28,0% dos espécimes e para a detecção de *A. actinomycetemcomitans* houve concordância em 71,0% dos casos. A maior discrepância observada entre os dois métodos refere-se a resultados positivos por PCR e negativos por cultura, especialmente na detecção de *T. forsythensis*, com 69,0% dos espécimes positivos por PCR e negativos por cultura microbiológica. Resultados negativos obtidos com o emprego de PCR e positivos por cultura foram observados em 2,0% dos espécimes no que se refere à pesquisa de *T. forsythensis*, em 6,0% para *C. rectus*, em 12,0% para *A. actinomycetemcomitans* e em 16,0% para *P. intermedia/nigrecens*.

Ali *et al.* (1997) compararam as técnicas *checkerboard* e cultura para avaliar a ocorrência de algumas espécies bacterianas em pacientes com

periodontite e observaram que um número significativamente maior de pacientes apresentava resultados positivos para *P. gingivalis*, *T. forsythensis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* e *F. nucleatum*, quando examinados por *checkerboard*. Para os autores, a ocorrência de reações inespecíficas entre DNA de espécies relacionadas, como *P. intermedia* e *P. nigrescens*, ou mesmo entre organismos não relacionados, poderia explicar este resultado.

Papapanou *et al.* (1997) observaram que a prevalência de *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* e *T. forsythensis* em bolsas periodontais, avaliada pelo emprego de *checkerboard*, é elevada, quando comparada com os dados obtidos por cultura microbiológica. Em contraste, os autores verificaram prevalência maior de *C. rectus* (cerca de 89%) detectada por cultivo do que pelo emprego do método genético (aproximadamente 29%). Este fato pode ser justificado pela ausência de características específicas da colônia, que poderia ser confundida com colônias de outras espécies bacterianas, como *Bacteroides gracilis*, levando a resultados superestimados. A frequência de detecção de *A. actinomycetemcomitans* e *E. corrodens* foi semelhante com o emprego de ambos os métodos. Para os autores, a eficiência destas técnicas varia de acordo com a espécie bacteriana analisada.

Os dados apresentados por Papapanou *et al.* (1997) diferem daqueles obtidos neste estudo, em que *E. corrodens* foi detectada com maior frequência quando PCR foi empregada. Esta discrepância poderia ser explicada pela utilização de meio de cultivo seletivo para o isolamento desta espécie bacteriana, o que pode ter limitado o crescimento de algumas linhagens. Além disso, a obtenção de cultura pura foi realizada pela seleção de algumas colônias, com base na avaliação de características macroscópicas; este procedimento pode ter subestimado a frequência do microrganismo. Também deve ser considerada a possibilidade de se detectar células inviáveis pelo método genético.

Ávila-Campos e Velásquez-Meléndez (2002) apresentaram dados semelhantes aos do presente estudo em relação à eficiência da PCR para

detecção de periodontopatógenos. A prevalência de *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *C. rectus*, *E. corrodens*, *P. intermedia* e *T. denticola* foi significativamente mais alta do que aquela observada quando cultura foi utilizada como metodologia de detecção dos organismos.

Diferentemente dos resultados obtidos neste estudo, Boutaga *et al.* (2003) encontraram uma alta correlação entre resultados positivos e negativos obtidos por *real-time* PCR e cultura, para detecção de *P. gingivalis*. Todos os espécimes positivos por cultura microbiológica foram também positivos por PCR. Discrepância entre os resultados obtidos pelo emprego dos diferentes métodos foi observada para cerca de 10% dos espécimes analisados, sendo todos positivos por PCR e negativos por cultura.

Muitas razões podem explicar as variações observadas entre os níveis de detecção alcançados com o emprego dos métodos de cultura e de PCR. Maior sensibilidade da PCR pode ser explicada pela possibilidade de detecção de células viáveis e inviáveis, fato não observado na cultura. Outro fator de discrepância seria a possibilidade de organismos de uma determinada espécie estarem presentes em pequeno número na placa subgingival e, após diluições do espécime clínico para cultivo, sua detecção ser pouco provável. Homogeneização inadequada dos espécimes e fatores que afetam o crescimento de diferentes microrganismos, inclusive a presença, no espécime clínico, de espécies bacterianas capazes de produzir substâncias antagonistas, podem, também, interferir na recuperação desses microrganismos.

A técnica de PCR permite diferenciar microrganismos que apresentam alto grau de similaridade genética, como *P. intermedia* e *P. nigrescens*, dado importante já que estas espécies são freqüentemente habitantes de placa bacteriana subgingival. A baixa prevalência de *P. intermedia* relatada nos estudos que utilizam métodos genéticos pode ser explicada pelo fato de que a cultura microbiológica, seguida pela identificação das amostras isoladas por métodos bacteriológicos clássicos, não permite a discriminação das duas espécies.

PCR, geralmente, mostra excelentes limites de detecção. Assim, pequenos volumes do espécime clínico podem ser empregados. Porém, o microrganismo alvo, se presente em baixas concentrações no espécime, pode não estar presente na alíquota a ser avaliada. Além disso, amostras clínicas podem conter enzimas inibidoras capazes de dificultar ou impedir o processo de amplificação (CHEN e SLOTS, 1999).

A PCR tem sido considerada uma técnica potencialmente ideal para a detecção de microrganismos periodontais. É relativamente fácil de ser executada, com poucas chances de ocorrência de reações inespecíficas, quando a reação é bem delineada e realizada em condições adequadas. Como já comentado, é uma técnica de grande sensibilidade, capaz de detectar microrganismos presentes em níveis baixos, bem como células inviáveis. Assim, em estudos de microbiologia oral aplicada, deve-se estar atento para o fato de que organismos desprovidos de relevância clínica também podem ser detectados.

Diversos estudos consideram a cultura microbiológica como o método padrão ouro para a detecção de microrganismos em espécimes periodontais. Independentemente dessa discussão, deve-se enfatizar que a cultura é o único método que possibilita o isolamento do microrganismo. Assim, as amostras podem ser armazenadas e empregadas em outros estudos que venham a se tornar relevantes ou oportunos, além de permitir o estudo de características fenotípicas do organismo, muitas vezes relacionadas à virulência do mesmo, incluindo o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos.

### 6.2.5 ASSOCIAÇÕES ENTRE GRUPOS MICROBIANOS DETECTADOS COM MAIOR FREQUÊNCIA

A cavidade oral alberga uma microbiota extremamente rica e diversificada. As espécies bacterianas presentes nos vários sítios da cavidade oral coexistem harmonicamente. Entretanto, em condições específicas, que favorecem determinadas espécies bacterianas, a doença periodontal pode se estabelecer. Associações bacterianas, tanto positivas como negativas, podem desempenhar papéis significativos nessas infecções mistas, favorecendo a colonização por periodontopatógenos. Por outro lado, certas interações bacterianas podem se relacionar à manutenção da saúde periodontal, prevenindo a colonização de sítios subgengivais por bactérias patogênicas. Um dos objetivos deste estudo foi avaliar as possíveis associações entre patógenos periodontais putativos isolados com maior frequência da população estudada.

Quando os espécimes obtidos de pacientes com periodontite crônica foram avaliados por cultura, observou-se associação positiva entre *F. varium* e *F. nucleatum* (TAB. 8). Já nos pacientes com periodontite agressiva, independentemente da técnica de detecção, diversas associações positivas foram observadas, mais frequentemente entre *P. intermedia* e *E. corrodens*, *P. nigrescens* e *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *T. denticola*, *T. forsythensis* e *F. nucleatum*, *T. forsythensis* e *E. corrodens* e *T. forsythensis* e *T. denticola* (TAB. 9 e 11).

Interações microbianas podem estar relacionadas a fatores nutricionais. Socransky *et al.* (1964) mostraram que várias espécies bacterianas são capazes de estimular o crescimento de *T. denticola*, fornecendo fatores nutricionais. Ter Steeg e Van der Hoeven (1990) identificaram quatro espécies capazes de estimular o crescimento de espiroquetas, *P. intermedia*, *Eubacterium nodatum*, *Veillonella parvula* e *F. nucleatum*. Entretanto, no presente estudo, *P. intermedia* e *F. nucleatum* não estavam associados a *T. denticola*.

Socransky *et al.* (1988) relataram várias associações bacterianas que poderiam estar relacionadas à gravidade das lesões periodontais. A combinação de *F. nucleatum*, *T. forsythensis* e *C. rectus* poderia estar relacionada ao aumento de profundidade das bolsas periodontais. De acordo com os autores, *F. nucleatum* provavelmente forneceria um fator de crescimento para *T. forsythensis*, que seria o principal patógeno nesta infecção mista. Mutualismo entre *T. forsythensis* e *F. nucleatum* já foi demonstrado *in vitro*, mas o fator de crescimento ainda não foi identificado (DZINK *et al.*, 1986). Em alguns pacientes analisados neste estudo, associação positiva entre *T. forsythensis* e *F. nucleatum* também foi observada, como mostra a tabela 11, o que confirma estes relatos.

Características que podem influenciar a capacidade agressora de microrganismos, como habilidade de coagregação e estabelecimento de relações sinérgicas com outras espécies bacterianas, especialmente bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro, já foram demonstradas para *F. nucleatum*. Este periodontopatógeno é capaz de reduzir o potencial de oxi-redução, requisito primário para a colonização por bactérias anaeróbias (GHARBIA *et al.*, 1989; BAUMGARTNER *et al.*, 1992; GRENIER, 1994; FEUILLE *et al.*, 1996; EBERSOLE *et al.*, 1997). Neste estudo, foram observadas associações positivas entre outras bactérias anaeróbias mais fastidiosas, como *T. forsythensis* e *Fusobacterium* spp. (TAB. 11).

Grenier (1992) demonstrou a existência de relação positiva entre *P. gingivalis* e *T. denticola*. Um meio de cultura complexo, sem hemina, no qual nenhuma destas espécies cresceria isoladamente, permitiu o co-cultivo destes microrganismos, mostrando a cooperação entre estas espécies. Simonson *et al.* (1992) observaram que a presença de *P. gingivalis* é um pré-requisito para a subsequente detecção de *T. denticola* em bolsas periodontais.

Outros relatos demonstraram que várias espécies bacterianas favorecem o crescimento de *P. gingivalis*. *Propionibacterium acnes* (O'CONNOR *et al.*, 1982), *C. rectus* (MAYRAND E GRENIER, 1998), *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus morbillorum* e *Streptococcus mutans* (HILLMAN *et al.*, 1985)



são capazes de produzir compostos essenciais para aquela espécie bacteriana.

Associação positiva entre *P. gingivalis* e *F. nucleatum* foi observada por Gharbia *et al.* (1989) em placa subgengival. A existência de associação entre estes microrganismos não pôde ser avaliada neste estudo, devido à baixa frequência de detecção de *P. gingivalis* nos espécimes clínicos analisados por cultura microbiológica. Relação sinérgica entre estas espécies também foi demonstrada em infecções experimentais em camundongos, nos quais o potencial patogênico de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* foi maior na infecção mista (BAUMGARTNER *et al.*, 1992; FEUILLE *et al.*, 1996; EBERSOLE *et al.*, 1997).

Análise de amostras de placa subgengival de sítios periodontais ativos e inativos, realizada por Socransky *et al.* (1988), sugeriu associação entre profundidade de bolsas periodontais e perda de inserção e *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *S. intermedius*. Este mesmo estudo demonstrou existência de interação positiva entre *P. gingivalis* e *P. melaninogenica* e entre *F. nucleatum* e *Actinomyces* spp.

Riviere *et al.* (1996), avaliando quais espécies bacterianas poderiam interagir com *P. gingivalis* na placa subgengival, confirmou a existência de forte associação com *C. rectus*, independente do *status* periodontal. Algumas espiroquetas orais e *E. corrodens* também foram frequentemente detectadas em associação com *P. gingivalis* em sítios periodontais com gengivite. *T. denticola* e *Treponema socranskii* estavam associadas a *P. gingivalis* somente em indivíduos com periodontite.

Está bem estabelecido que *A. actinomycetemcomitans* tem participação efetiva na etiologia da periodontite agressiva. Entretanto, *P. gingivalis* também é frequentemente recuperada (SLOTS, 1999; TONETTI e MOMBELLI, 1999). Associação positiva entre estas espécies bacterianas foi descrita por Ashimoto *et al.* (1996) e Dogan *et al.* (2003).

Outras associações bacterianas positivas na placa subgengival de pacientes com periodontite já foram descritas, como interações sinérgicas entre *P. gingivalis* e *P. intermedia/nigrescens* (ALI *et al.*, 1994; ASHIMOTO *et al.*, 1996; DOGAN *et al.*, 2003), *P. gingivalis* e *T. forsythensis* (ALI *et al.*, 1994; LOTUFO *et al.*, 1994; RAMS *et al.*, 1997; MULLALLY *et al.*, 2000; DOGAN *et al.*, 2003) e *T. forsythensis* e *P. intermedia/nigrescens* (ALI *et al.*, 1994; ASHIMOTO *et al.*, 1996; RAMS *et al.*, 1997; MULLALLY *et al.*, 2000; DOGAN *et al.*, 2003). Entretanto, estas associações não foram observadas neste estudo.

Fatores inibidores de crescimento produzidos por bactérias da cavidade oral desempenham papel crítico na ecologia de sítios subgengivais. Neste estudo, nos pacientes com periodontite crônica, foi observada associação negativa entre *P. nigrescens* e *P. intermedia*, *T. denticola* e *T. forsythensis* e *P. intermedia* e *T. denticola*. Foram detectadas relações antagônicas entre *F. nucleatum* e *E. corrodens*, *E. corrodens* e *F. nucleatum*, *E. corrodens* e *A. actinomycetemcomitans*, *A. actinomycetemcomitans* e *E. corrodens* e entre *T. denticola* e *T. forsythensis* isoladas de pacientes com periodontite agressiva.

Estudos de Takazoe *et al.* (1984) e Höhne *et al.* (1993) revelaram que *P. gingivalis* apresenta efeito negativo limitado sobre outras bactérias presentes na cavidade oral. Entretanto, Van Winkelhoff *et al.* (1987) demonstraram, *in vitro*, que este é o bastonete anaeróbio produtor de pigmento negro que apresenta a maior habilidade de inibir o crescimento de outros microrganismos presentes na placa subgengival. Os autores detectaram atividade antagonista contra *P. intermedia*, *P. endodontalis*, *P. loescheii* e *P. melaninogenica*.

Dados da literatura têm demonstrado que várias espécies bacterianas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *S. mutans*, *P. melaninogenica* e *P. intermedia*, podem interferir no crescimento de *P. gingivalis* (TAKAZOE *et al.*, 1984; GRENIER, 1996, RODRIGUES *et al.*, 1999). Existem relatos da ocorrência de relação antagônica entre *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans*. Lima *et al.* (2002) demonstraram, *in vitro*, a

sensibilidade de *P. gingivalis* a substâncias antagonistas produzidas por amostras de *A. actinomycetemcomitans* isoladas de pacientes com periodontite. Por outro lado, esta habilidade inibidora não pôde ser observada contra amostras isoladas de indivíduos com periodonto saudável.

### **6.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Diversas espécies bacterianas coexistem em harmonia na cavidade oral, mantendo o equilíbrio entre as interações microbianas positivas e negativas. Várias condições podem interromper este equilíbrio, permitindo o aparecimento de doenças infecciosas. Os estudos relacionados às infecções mistas, nas quais cada componente bacteriano não mostra sua patogenicidade, torna-se um dilema. Por um lado, espécies dominantes presentes em lesões já estabelecidas, contempladas com vários fatores de virulência, nem sempre requerem outras bactérias ou fatores do hospedeiro para expressar sua patogenicidade. Por outro lado, na comunidade bacteriana, espécies sem características patogênicas claras participam do processo infeccioso, estabelecendo uma lesão clínica. Em outras palavras, a habilidade para invadir não depende somente de determinantes de virulência de espécies bacterianas presentes, mas deve também ser consequência de interações bacterianas. Assim, parece plausível que interferir nestas interações poderia ser medida preventiva no controle das doenças periodontais. Se a eliminação de patógenos periodontais da placa subgingival significa ausência de doença, a terapia poderia se basear em dois processos: eliminação destes patógenos e colonização por espécies benéficas (MAYRAND e GRENIER, 1998).

Como para qualquer doença de etiologia polimicrobiana, particularmente aquelas relacionadas ao desequilíbrio da microbiota indígena, pesquisas adicionais são necessárias para definir os papéis dos microrganismos e suas interações na etiopatogênese das doenças periodontais, tanto no seu início

como na sua progressão.

As dificuldades encontradas na procura dos agentes etiológicos da doença periodontal incluem problemas técnicos, tais como obter um espécime clínico adequado, bem como dificuldades na dispersão, cultivo e identificação das amostras recuperadas. Um segundo conjunto de problemas é de natureza mais conceitual e envolve a falta de um entendimento claro da patogênese da doença periodontal. Estas dificuldades incluem problemas associados à natureza da doença periodontal e da própria microbiota oral. No primeiro grupo, podem ser destacadas a dificuldade de avaliar o estado de atividade das lesões periodontais, a inabilidade para diferenciar as formas das doenças entre os diferentes indivíduos e a possibilidade de múltiplas doenças em um mesmo indivíduo. No segundo, devem ser mencionados fatores como a complexidade da microbiota, a natureza mista das infecções e a distinção entre espécies oportunistas presentes em níveis elevados e verdadeiros patógenos.

Desta forma, o desenvolvimento e o aprimoramento de testes para detecção de periodontopatógenos é fundamental para que se possam traçar estratégias para prevenção e controle destas doenças. Assim, métodos rápidos de diagnóstico microbiológico, como PCR, poderão ter impacto significativo na terapia periodontal, possibilitando a identificação de indivíduos ou sítios periodontais que apresentam risco de estabelecimento ou progressão da periodontite e a avaliação do sucesso do tratamento.

## 7 CONCLUSÕES

A detecção de todos os periodontopatógenos putativos pesquisados indica que ambas as metodologias empregadas no estudo, cultura microbiológica e PCR, eram adequadas ao estudo proposto.

Não foi possível, ainda, neste estudo, padronizar método genético para detectar *P. gingivalis* e *A. actinomycetemcomitans* na placa subgingival.

Os resultados obtidos pelo emprego dos métodos microbiológico convencional e genético demonstram associação de *Fusobacterium* spp., *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *T. forsythensis* e *T. denticola* com as formas crônica e agressiva de periodontite, de *A. actinomycetemcomitans* apenas com periodontite agressiva e *E. corrodens* com periodontite crônica.

Rapid ID 32 A se mostrou mais preciso para a identificação de bastonetes anaeróbios produtores de pigmento negro se comparado a testes bioquímicos convencionais.

A análise comparativa dos métodos utilizados mostrou que PCR é mais sensível e específica que cultura microbiológica para a detecção de periodontopatógenos putativos.

As associações observadas nos espécimes obtidos de pacientes com periodontite agressiva diferem daquelas detectadas, em pacientes com periodontite crônica, o que corrobora a hipótese de que associações específicas são importantes na expressão diferenciada da doença periodontal.

Apesar das limitações inerentes a estudos desta natureza, os dados obtidos reforçam as evidências de que membros específicos da microbiota indígena da cavidade oral estão envolvidos na etiopatogenia da doença periodontal, nas suas diferentes apresentações clínicas, e confirma a importância da realização de estudos desta natureza, em diferentes regiões geográficas, para melhor compreensão de aspectos relacionados à biologia destes microrganismos e a sua interação com o hospedeiro.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBANDAR, J.M.; BROWN, L.J.; LÖE, H. Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 68, n. 10, p. 973-981, Oct. 1997.
2. ALBANDAR, J.M.; BUISCHI, Y.A.; BARBOSA, M.F. Destructive forms of periodontal disease in adolescents. A 3-year longitudinal study. **J. Periodontol.**, Chicago, v.62, n.6, p.370-376, June 1991.
3. ALBANDAR, J.M. Global risk factors and risk indicators for periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.29, n.1, p.177-206, Apr. 2002.
4. ALBANDAR, J.M.; RAMS, T.E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.29, n.1, p.7-10, Apr. 2002.
5. ALBANDAR, J.M.; TINOCO, E.M. Global epidemiology of periodontal diseases in children and young persons. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.29, n.1, p.153-176, Apr. 2002.
6. ALI, R.W.; JOHANNESSEN, A.C.; DAHLEN, G.; SOCRANSKY, S.S.; SKAUG, N. Comparison of the subgingival microbiota of periodontally healthy and diseased adults in northern Cameroon. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 24, n.11, p.830-835, Nov. 1997.
7. ALI, R.W.; SKAUG, N.; NILSEN, R.; BAKKEN, V. Microbial associations of 4 putative periodontal pathogens in Sudanese adult periodontitis patients determined by DNA probe analysis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.65, n.11, p.1053-1057, Nov. 1994.
8. ALI, R.W., VELCESCU, C.; JIVANESCU, M.C.; LOFTHUS, B.; SKAUNG, N. Prevalence of 6 putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples from Romanian adult periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 23, n.2, p. 133-139, Feb. 1996.
9. ALPAGOT, T.; WOLFF, L.F.; SMITH, Q.T.; TRAN, S.D. Risk indicators for periodontal disease in a racially diverse urban population. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, n.11, p.982-988, Nov. 1996.
10. ALSINA, M.; OLLE, E.; FRIAS, J. Improved, low-cost selective culture medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.39, n.2, p.509-513, Feb. 2001.
11. ANERUD, A.; LÖE, H.; BOYSEN, H. The natural history and clinical course of calculus formation in man. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.18, n.3, p.160-170, Mar. 1991.

12. APPELBAUM, P.C.; KAUFMANN, C.S.; KEIFER, J.C.; VENBRUX, H.J. Comparison of three methods for anaerobe identification. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.18, n.3, p.614-621, Sept. 1983.
13. ARMITAGE, G.C. DEVELOPMENT of a classification system for periodontal disease and conditions. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.4, n.1, p.1-6, Dec. 1999.
14. ARMITAGE, G.C. Periodontal diagnoses and classification of periodontal disease. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.34, n.1, p.9-21, Feb. 2004.
15. ARZESE, A.; MINISINI, R.; BOTTA, G.A. Evaluation of an automated system for identification of anaerobic bacteria. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Wiesbaden, v.13, n.2, p.135-141, Feb. 1994.
16. ASHIMOTO, A.; CHEN, C.; BAKKER, I.; SLOTS, J. Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.11, n.4, p.266-273, Aug. 1996.
17. ASIKAINEN, S.; CHEN, C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.20, n.1, p.65-81, June 1999.
18. ÁVILA-CAMPOS, M.J.; VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.44, n.1, p.1-5, jan./fev. 2002.
19. ÁVILA-CAMPOS, M.J.; CARVALHO, M.A.R.; RAYMUNDO, N.L.S.; FARIAS L.M.; DAMASCENO, C.A.V.; CISALPINO, E.O. "In vitro" susceptibility to imipenem of *Actinobacillus (Haemophilus) actinomycetemcomitans* strains isolated in Brazil. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.22, p.269-72, 1991
20. BAEHNI, P.; TSAI, C.C.; MCARTHUR, W.P.; HAMMOND, B.F.; SHENKER, B.F.; TAICHMAN, N.S. Leukotoxic activity in different strains of the bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolated from juvenile periodontitis in man. **Arch. Oral Biol.**, v.26, n.8, p.671-676, Aug. 1981.
21. BAEHNI, P.; TSAI, C.C.; MCARTHUR, W.P.; HAMMOND, B.F.; TAICHMAN, N.S. Interaction of inflammatory cell and oral micro-organisms. VIII Detection of leukotoxin activity of plaque-derived gram-negative microorganisms. **Infect. Immun.**, Washington, v.24, n.1, p.233-243, Apr. 1979.
22. BAEUM, V.; SCHEUTZ, F. Periodontal diseases in Africa. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.29, n.1, p.79-1013, Apr. 2002

23. BAUMGARTNER, J.C.; FALKLER, W.A.; BECKERMAN, T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 7, n.4, p.253-256, Aug. 1992.
24. BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 1ed. São Paulo: Melhoramentos, 1984. 1234p.
25. BOOTH, V.; ASHLEY, F. The oral health of a group of 15-17 years old British school children of different ethnic origin. **Community Dent. Health**, Houndsmills, v.6, n.3, p.195-205, Sept. 1989.
26. BOUTAGA, K.; VAN WINKELHOFF, A.J.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.; SAVELKOUL, P.H. Comparison of real-time PCR and culture for detection of *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.41, n.11, p.4950-4954, Nov. 2003.
27. BRAHAM, P.H.; MONCLA, B.J. Rapid presumptive identification and further characterization of *Bacteroides forsythus*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.3, p.649-654, Mar. 1992.
28. CARVALHO, M.A.R. **Isolamento, caracterização e conservação de *Bacteroides melaninogenicus* da cavidade oral humana**. Belo Horizonte, 1975. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais.
29. CHEN, C.; SLOTS, J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.20, n.1, p.53-64, June 1999
30. CHEN, C.K.C.; WILSON, M.E. *Eikenella corrodens* in human oral and non-oral infections: a review. **J. Periodontol.**, Chicago, v.63, n.12, p.941-953, Dec. 1992.
31. CHRISTERSSON, L.A.; FRANSSON, C.L.; DUNFORD, R.G.; ZAMBON, J.J. Subgingival distribution of periodontal pathogenic microorganisms in adult periodontitis, **J. Periodontol.**, Chicago, v.63, n.5, p.418-425, May 1992.
32. COLOMBO, A.P.; TELES, R.P.; TORRES, M.C.; SOUTO, R.; ROSALEM, W.J.; MENDES, M.C.; UZEDA, M. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 73, n.4, p.360-369, Apr. 2002.
33. CORBET, E.F.; ZEE, K.Y.; LO, E.C.M. Periodontal disease in Asia and Oceania. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.29, n.1, p.122-152, Apr. 2002.
34. CONRADS, G.; BRAUNER, A. Non-radioactively labelled DNA probes for the detection of periodontopathogenic *Prevotella* and *Porphyromonas*



- species. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.6, n.2-3, p.115-120, Mar. 1993.
35. CONRADS, G.; GHARBIA, S.E.; GULABIVALA, K.; LAMPERT, F.; SHAH, H.N. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v.23, n.7, p.433-438, Jul. 1997.
  36. CONRADS, G.; MUTTERS, R.; FISCHER, J.; BRAUNER, A.; LÜTTICKEN, R.; LAMPERT, F. PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of peridontally healthy individuals. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 67, n.10, p. 994-1003, Oct. 1996.
  37. CONTI, R.; MAYER, M.P.A.; ZELANTE, F. Phenotypic identification and antimicrobial susceptibility of black-pigmented bacterial. **Congress on Anaerobic Bacteria and Anaerobic Infections Abstract Book.**, p.151, 1998.
  38. CUTLER, C.W.; KALMAR, J.R., GENCO, C.A. Pathogenic strategies of oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v.3, n.2, p.45-51, Feb. 1995
  39. DAHLÉN, G.; MANJI, F.; BAEUM, V.; FEJERSKOV, O. Black-pigmented *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque of adult Kenyans. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.16, n.5, p.305-310, May 1989.
  40. DAHLÉN, G.; MANJI, F.; BAEUM, V.; FEJERSKOV, O. Putative periodontopathogens in "diseased" and "non-diseased" persons exhibiting poor oral hygiene. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.19, n.1, p.35-42, Jan, 1992.
  41. DAHLÉN, G.G. Black pigmented Gram negative anaerobes in periodontitis. **Fems Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.6, n.2-3, p.181-192, Mar. 1993.
  42. DARBY, I.B.; HODGE, P.J.; RIGGIO, M.P.; KINANE, D.F. Microbial comparison of smoker and non-smoker adult and early-onset periodontitis patients by polymerase chain reaction. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.27, n.6, p.417-424, June 2000.
  43. DARVEAU, R.P.; TANNER, A.; PAGE, R.C. The microbial challenge in periodontitis. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.14, n.1, p.12-32, June 1997.
  44. DEWHIRST, F.E.; TAMER, M.A., ERICSON, R.E.; LAU, C.N.; LEVANOS, V.A.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; PASTER, B.J. The diversity of periodontal spirochetes by 16S rRNA analysis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.15, n.3, p.196-202, June 2000.
  45. DOGAN, B.; ANTINHEIMO, J.; CETINER, D.; BODUR, A.; EMINGIL, G.; BUDUNELI, E.; UYGUR, C.; FIRATLI, E.; LAKIO, L.; ASIKAINEN, S. Subgingival

- microflora in Turkish patients with periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.6, p.803-814, June 2003.
46. DOWNES, J.; KING, A.; HARDIE, J.; PHILLIPS, I. Evaluation of the Rapid ID 32A system for identification of anaerobic Gram-negative bacilli, excluding the *Bacteroides fragilis* group. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v.5, n.6, p.319-326, June 1999.
  47. DZINK, J.L.; TANNER, A.C.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.12, n.8, p.648-659, Sept. 1985.
  48. DZINK, J.L.; SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.15, n.5, p.316-323, May 1988.
  49. DZINK, J.L.; SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.L. Interaction between *Bacteroides forsythus* and *Fusobacterium nucleatum*. **J. Dent. Res.**, Washington, v.65 (special issue), p.853, 1986 (Abstract).
  50. EBERSOLE, J.L.; FEUILLE, F.; KESAVALU, L.; HOLT, S.C. host modulation of tissue destruction caused by periodontopathogens: effects on a mixed microbial infection composed of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. **Microb. Pathog.**, London, v.23, n.1, p.23-32, Jul. 1997.
  51. EDWARDSSON, S.; BING, M.; AXTELIUS, B.; LINDBERG, B.; SÖDERFELDT, B.; ATTSTRÖM, R. The microbiota of periodontal pockets with different depths in therapy-resistant periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.26, n.3, p.143-152, Mar. 1999.
  52. ELEY, B.M.; COX, S.W. Advances in periodontal diagnosis. 4. Potential microbiological markers. **Br. Dent. J.**, London, v.184, n.4, p.161-166, Feb. 1998.
  53. FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R.; DAMASCENO, C.A.V.; CISALPINO, E.O.; COSTA, J.E. Caracterização morfológica, bioquímica e fisiológica de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isolados de lesões periodontais humanas. **Rev. Microbiol.**, São Paulo, v.17, n.4, p. 296-306, out/dez. 1986.
  54. FEUILLE, F.; EBERSOLE, J.L.; KESAVALU, L.; STEPFEN, M.J.; HOLT, S.C. Mixed infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in murine lesion model: potential synergistic effects on virulence. **Infect. Immun.**, Washington, v.64, n.6, p.2094-2100, June 1996.
  55. FINEGOLD, S.M.; STRONG, C.A.; MCTEAGUE, M.; MARINA, M. The importance of black pigmented Gram negative anaerobe in human infection. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.16, n.2-3, p. 77-82, Mar. 1993.

56. FLEMMIG, T.F., RÜDIGER, S., HOFMANN, U., SCHMIDT, H., PLASCHKE, B., STRÄTZ, A., KLAIBER, B., KARCH, H. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival plaque by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.33, n.12, p.3102-3105, Dec.1995.
57. FOX, J.G.; DEWHIRST, F.E.; FRASER, G.J.; PASTER, B.J.; SHAMES, B.; MURPHY, J.C. Intracellular *Campylobacter* - like organism from ferrets and hamsters with proliferative bowel disease is a *Desulfovibrio* sp. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.32, n.5, p.1229-1237, May 1994.
58. FUKUI, K.; KATO, N.; KATO, H.; WATANABE, K.; TATEMATSU, N. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* carriage among family members with subclinical periodontal disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.10, p.3141-3145, Oct. 1999.
59. GARCIA, L.; TERCERO, J.C.; LEGIDO, B.; RAMOS, J.A.; ALEMANY, J.; SANZ, M. Rapid detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia* and *Porphyromonas gingivalis* by multiplex PCR. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v.33, n.1, p.59-64, Jan. 1998.
60. GENCO R.J.; LOOS B.G. The use of genomic DNA fingerprinting in studies of the epidemiology of bacteria in periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.18, n.6, p.396-405, Jul. 1991
61. GHARBIA, S.E.; HAAPASALO, M.; SHAH, H.N.; KOTIRANTA, A.; LOUNATMAA, K.; PEARCE, M.A.; DEVINE, D.A. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. **J. Periodontol.**, Chicago, v.65, n.1, p.56-61, Jan. 1994.
62. GHARBIA, S.E.; SHAH, H.N.; WELCH, S.G. The influence of peptides on the uptake of amino acids in *Fusobacterium*: predicted interaction with *Porphyromonas gingivalis*. **Curr. Microbiol.**, New York, v. 19, p.2331-235, 1989.
63. GJERMO, P.; BELLINI, H.T.; PEREIRA SANTOS, V.; MARTINS, J.G.; FERRACYOLI, J.R. Prevalence of bone loss in a group of Brazilian teenagers assessed on bite-wing radiographs. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.11, n.2, p.104-113, Feb. 1984
64. GJERMO, P.; ROSING, C.K.; SUSIN, C.; OPPERMANN, R. Periodontal diseases in Central and South America. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.29, n.1, p.70-78, Apr. 2002.
65. GONCHAROFF, P.; FIGURSKI, D.H.; STEVENS, R.H.; FINE, D.H. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: polymerase chain reaction amplification of *lktA*-specific sequences. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.8, n.2, p.105-110, Apr. 1993.

66. GRENIER, D. Nutritional interactions between two suspected periodontopathogens, *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. **Infect. Immun.**, Washington, v.60, n.12, p.5298-5301, Dec. 1992.
67. GRENIER, D. Effect of proteolytic enzymes on the lysis and growth of oral bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, n.4, p.24-28, Aug. 1994.
68. GRENIER, D. Antagonistic effect of oral bacteria towards *Treponema denticola*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.5, p.1249-1252, May 1996.
69. GRENIER, D.; MAYRAND, D. Adult periodontitis: an ecological perspective of mixed infections. **Trends Microbiol.**, Cambridge, v.3, n.4, p.148-153, Apr. 1995.
70. GRENIER, D.; MAYRAND, D. Periodontitis an ecological imbalance. In: KURAMITSU, H.K.; ELLEN, R.P. **Oral bacterial ecology**; the molecular basis. 1ed. Wymondham: Horizon Scientific Press, 2000. Cap.6, p.275-310.
71. GUNSOLLEY, J.C.; RANNEY, R.R.; ZAMBON, J.J.; BURMEISTER, J.A.; SCHENKEIN, H.A. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families afflicted with periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.61, n.10, p.643-648, Oct.1990.
72. HAFFAJEE, A.D.; CUGINI, M.A.; TANNER, A.; POLLACK, R.P.; SMITH, C.; KENT JR., R.L.; SOCRANSKY, S.S. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, n.5, p. 346-353, May 1998.
73. HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.5, n.1, p.78-111, June 1994.
74. HAN, N.,M.; XIAO, X.; ZHANG, L.; RI, X.; ZHANG, J.Z.; TONG, Y.H.; YANG, M.R.; XIAO, Z.R. Bacteriological study of juvenile periodontitis in China. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v.26, n. 5, p.409-414, Sept. 1991.
75. HARPER-OWEN, R.; DYMOCK, D.; BOOTH, V.; WEIGHTMAN, A.J.; WADE, W.G. Detection of unculturable bacteria in periodontal health and disease by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.5, p.1469-1473, May 1999.
76. HEAD, C.B.; RATNAM, S. Comparison of API ZYM system with API AN-Ident, API 20A, Minitek Anaerobe II, and RapID-ANA systems for identification of *Clostridium difficile*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.26, n.1, p.144-146, Jan. 1988.
77. HENDERSON, B.; NAIR, S.P.; WARD, J.M.; WILSON, M. Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus*

- actinomycetemcomitans*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.57, p.29-55, 2003.
78. HILLMAN, J.D.; SOCRANSKY, S.S.; SHIVERS, M. The relationships between streptococcal species and periodontopathic bacteria in human dental plaque. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v.30, n.11-12, p.791-795, Nov./Dez. 1985.
79. HOHNE, C.; NEUMANN, D.; JENTZSCH, M. Antimicrobial activities of black-pigmented Gram-negative anaerobes. **Fems Immun. Med. Microbiol.**, Amsterdam, v.6, n.2-3, p.235-240, Mar. 1993.
80. HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P.; MOORE, W.E.C. **Anaerobe laboratory manual**. Virginia: The Virginia Polytechnic Institute and State University Anaerobe Laboratory. 4.ed. 1977. 156p.
81. HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins. 9.ed. 1994. 787p.
82. HOLT, S.C. KESAVALU, L.; WALKER, S.; GENCO, C.A. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontol.** 2000, Munksgaard, v.20, n.1, p.168-238, June 1999.
83. ISHIHARA, K.; NAITO, Y.; KATO, T.; TAKAZOE, I.; OKUDA, K.; EGUCHI, T.; NAKASHIMA, K.; MATSUDA, N.; YAMASAKI, K.; HASEGAWA, K.; et al. A sensitive enzymatic method (SK-013) for detection and quantification of specific periodontopathogens. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.27, n.2, p.81-85, Mar. 1992
84. JEKEL, J.F.; ELMORE, J.G.; KATZ, D.L. **Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva**. Porto Alegre: Artmed. 1999. 328p.
85. JENKINS, S.A.; DRUCKER, D.B.; KEANEY, M.G.; GANGULI, L.A. Evaluation of the RAPID ID 32A system for the identification of *Bacteroides fragilis* and related organisms. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.71, n.4, p.360-365, Oct. 1991.
86. JOUSIMIES-SOMER, H.R. Update on the taxonomy and the clinical and laboratory characteristic of pigmented anaerobic Gram negative rod. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.20, suppl.2, p.187-191, June 1995
87. KAMMA, J.J.; NAKOU, M.; GMUR, R.; BAEHNI, P.C. Microbiological profile of early onset/aggressive periodontitis patients. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.19, n.5, p.314-321, Oct. 2004.
88. KAMMA, J.J.; NAKOU, M.; MANTI, F.A. Microbiota of rapidly progressive periodontitis lesions in association with clinical parameters. **J. Periodontol.**, Chicago, v.65, n.11, p.1073-1078, Nov. 1994.
89. KARACHEWSKI, N.O.; BUSCH, E.L.; WELLS, C.L. Comparison of PRAS II, RapID ANA, and API 20A systems for identification of anaerobic

- bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.21, n.1, p.122-126, Jan. 1985.
90. KAUR, M.; FALKER, W.A. JR. Characterization of shared antigens of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.7, n.5, p.291-298, Oct. 1992.
  91. KAWADA, M.; YOSHIDA, A.; SUZUKI, N.; NAKANO, Y.; SAITO, T.; OHO, T.; KOGA, T. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* in relation to periodontal status assessed by real-time PCR. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.19, n.5, p.289-292, Oct. 2004.
  92. KINANE, D.F.; LINDHE, J. **Patogênese da periodontite**. In: LINDHE, T. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1999. Cap. 5, p. 127-152.
  93. KING, E.O.; TATUM, H.W. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus*. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.111, n.2, p.85-94, Sept./Oct. 1962.
  94. KITCH, T.T.; APPELBAUM, P.C. Accuracy and reproducibility of the 4-hour ATB 32A method for anaerobe identification. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.27, n.11, p.2509-2513, Nov. 1989.
  95. KUBONIWA, M.; AMANO, A.; KIMURA, K.R.; SEKINE, S.; KATO, S.; YAMAMOTO, Y.; OKAHASHI, N.; IIDA, T.; SHIZUKUISHI, S. Quantitative detection of periodontal pathogens using real-time polymerase chain reaction with TaqMan probes. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.19, n.3, p.168-176, June 2004.
  96. KURU, B.; YILMAZ, S.; NOYAN, U.; ACAR, O.; KADIR, T. Microbiological features and crevicular fluid aspartate aminotransferase enzyme activity in early onset periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.26, n.1, p.19-25, Jan. 1999.
  97. LAMELL, C.W.; GRIFFEN, A.L.; MCCLELLAN, D.L.; LEYS, E.J. Acquisition and colonization stability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in children. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.3, p.1196-1199, Mar. 2000.
  98. LAUGHON, B.E.; SYED, S.A.; LOESCHE, W.J. Rapid identification of *Bacteroides gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.15, n.2, p.345-346, Feb. 1982.
  99. LIMA, F.L. **Atividade leucotóxica de amostras de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* isoladas de seres humanos e de calitriquídeos**. Belo Horizonte, 1997. Dissertação - Universidade Federal de Minas Gerais.
  100. LIMA, F.L.; FARIAS, F.F.; COSTA, J.E.; CARVALHO, M.A.R.; ALVIANO, C.S.; FARIAS, L.M. Bacteriocin production by *Actinobacillus*

*actinomycescomitans* isolated from the oral cavity of humans with periodontal disease, periodontally healthy subjects and marmosets. **Res. Microbiol.**, Paris, v. 153, n.4, p. 45-52, May 2002.

101. LISTGARTEN, M. A.; LAI, C.H.; EVIAN, C.I. Comparative antibody titers to *Actinobacillus actinomycescomitans* in juvenile periodontitis, chronic periodontitis and periodontally health subjects. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v 8, n.3, p.155-164, June 1981.
102. LISTGARTEN, M.A. Microbiological testing in diagnosis of periodontal disease. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 63, n. 4, p. 332-337, Apr. 1992.
103. LISTGARTEN, M.A.; WONG, M.Y.; LAI, C.H. Detection of *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in an *A. actinomycescomitans* – positive patient population. **J. Periodontol.**, Chicago, v.66, n.2, p.158-164, Feb. 1995.
104. LÖE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. Experimental gingivitis in man. **J. Periodontol.**, Chicago, v.36, n.1, p.177-187, May-June 1965.
105. LOESCHE, W.J. DNA probe and enzyme analysis periodontal diagnostics. **J. Periodontol.**, Chicago, v.63, Suppl.12, p.1102-1109, Dec.1992.
106. LOESCHE, W.J.; SYED, S.A.; SCHIMIDT, E.; MORRISON, E.C. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.56, n. 8, p.447-456, Aug. 1985.
107. LOESCHE, W.J.; LOPATIN, D.E.; STOLL, J.; VAN POPERIN, N.; HUJOEL, P.P. Comparison of various detection methods for periodontopathic bacteria: can culture be considered the primary reference standard? **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.30, n.2, p.418-426, Feb. 1992.
108. LOESCHE, W.J. Chemotherapy of dental plaque infections. **Oral Sci. Rev.**, v.9, p.65-107, 1976.
109. LOCKER, D.; SLADE, G.D.; MURRAY, H. Epidemiology of periodontal disease among older adults: a review. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.16, n.1, p.16-33, Feb. 1998.
110. LOONEY, W.J.; GALLUSSER, A.J.; MODDE, H.K. Evaluation of the ATB 32 A system for identification of anaerobic bacteria isolated from clinical specimens. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.28, n.7, p.1519-1524, Jul. 1990.
111. LÓPEZ, N. J.; MELLADO, J.C.; LEIGHTON, G.X. Occurrence of *Actinobacillus actinomycescomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in juvenile periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, n.2, p.101-105, Feb. 1996.

112. LÓPEZ, N.J. Occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* in progressive adult periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.71, n.6, p.948-954, June 2000.
113. LOTUFO, R.F.; FLYNN, J.; CHEN, C.; SLOTS, J. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in human periodontitis. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, n.3, p.154-160, June 1994.
114. LYONS, S.R.; GRIFFEN, A.L.; LEYS, E.J. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.38, n.6, p.2362-2365, June 2000.
115. MACHTEI, E.E.; DUNFORD, R.; HAUSMANN, E.; GROSSI, S.G.; POWELL, J.; CUMMINS, D.; ZAMBON, J.J.; GENCO, R. Longitudinal study of prognostic factors in established periodontitis patients. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.24, n.2, p.102-109, Feb. 1997.
116. MAEDA, N.; OKAMOTO, M.; KONDO, K. ISHIKAWA, H.; OSADA, R.; TSURUMOTO, A.; FUJITA, H. Incidence of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in periodontal health and disease. **Microbiol. Immunol.**, Tokyo, v.42, n.9, p.583-589, 1998.
117. MAIDEN, M.F.; CARMAN, R.J.; CURTIS, M.A.; GILLET, I.R.; GRIFFITHS, G.S.; STERNE, J.A.; WILTON, J.M.; JOHNSON, N.W. Detection of high-risk groups and individuals for periodontal diseases: laboratory markers based on the microbiological analysis of subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.17, n.1, p.1-13, Jan. 1990.
118. MANDELL, R.L. A longitudinal microbiological investigation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Eikenella corrodens* in juvenile periodontitis. **Infect. Immun.**, Washington, v. 45, n.3, p. 778-780, Sept. 1984.
119. MANDELL, R.L.; SOCRANSKY, S.S. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.52, n.10, p.593-598, Oct. 1981.
120. MASSARA, F.E. **Detecção de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* em espécimes de placa subgingival de pacientes com periodontite de início precoce.** Belo Horizonte, 2001. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais.
121. MATSSON, L.; SJODIN, B.; BLOMQUIST, H.K. Periodontal health in adopted children of Asian origin living in Sweden. **Swed. Dent. J.**, Jonkoping, v.21, n.5, p.177-184, May 1997.
122. MÄTTÖ, J.; SAARELA, M.; VON TROIL-LINDEN, B.; KONONEN, E.; JOUSIMIES-SOMER, H.; TORKKO, H.; ALALUUSUA, S.; ASIKAINEN, S. Distribution and



- genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.11, n.2, p.96-102, Apr. 1996.
123. MAYRAND, D.; GRENIER, D. Bacterial interaction in periodontal disease. **Bull Inst. Pasteur**, Paris, v.96, n.2, p.125-133, Apr. 1998.
  124. MAYRAND, D.; HOLT, S.C. Biology of asaccharolytic black pigmented *Bacteroides* species. **Microbiol Rev.**, v.52, n.1, p.134-152, Mar. 1988.
  125. MIURA, M.; HAMACHI, T.; FUJISE, O.; MAEDA, K. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis* fimA genotypes in patients with aggressive periodontitis. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v. 49, n.2, p.147-152, Apr. 2005.
  126. MIYAZAKI, H.; PILOT, T.; LECLERCQ, M.H.; BARMES, D.E. Profiles of periodontal conditions in adolescents measured by CPITN. **Int. Dent. J.**, Guildford, v.41, n.2, p.67-73, Apr. 1991a
  127. MIYAZAKI, H.; PILOT, T.; LECLERCQ, M.H.; BARMES, D.E. Profiles of periodontal conditions in adults measured by CPITN. **Int. Dent. J.**, Guildford, v.42, n.2, p.74-80, Apr. 1991b.
  128. MOMBELLI, A.; GMUR, R.; GOBBI, C.; LANG, N.P. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in adult periodontitis. II. Characterization of isolated strains and effect of mechanical periodontal treatment. **J. Periodontol.**, Chicago, v.65, n.9, p.827-834, Sept. 1994.
  129. MOMBELLI, A.; LANG, N.P.; BURGIN, W.B.; GUSBERTI, F.A. Microbial changes associated with development of puberty gingivitis. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v.25, n.6, p.331-338, Nov. 1990.
  130. MOMBELLI, A.; MCNABB, H.; LANG, N.P. Black-pigmenting gram-negative bacteria in periodontal disease. II. Screening strategies for detection of *P. gingivalis*. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v.26, n.4, p.308-313, Jul. 1991.
  131. MOORE, W.E.C.; MOORE, L.H.; RANNEY, R.R.; SMIBERT, R.M.; SCHEKEIN, W.A. Race as an apparent influence on periodontal flora compositions. **J. Dent. Res.**, Washington, v.70 (special issue), p.818, 1991 (Abstract).
  132. MOORE, W.E.C.; MOORE, L.V.H. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.5, n.1, p.66-77, June 1994.
  133. MOORE, W.E.C; HOLDEMAN, L.V.; CATO, E.P. Comparative bacteriology of juvenile periodontitis. **Infect. Immun.**, Washington, v. 48, p. 507-519, 1985.
  134. MOTER, A.; HOENIG, C.; CHOI, B.K.; RIEP, B.; GOBEL, U.B. Molecular epidemiology of oral treponemes associated with periodontal disease. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.36, n.5, p.1399-1403 May 1998.

135. MULLALLY, B.H.; DACE, B.; SHELBURNE, C.E.; WOLFF, L.F.; COULTER, W.A. Prevalence of periodontal pathogens in localized and generalized forms of early-onset periodontitis. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.35, n.4, p.232-241, Aug. 2000.
136. MURRAY, P.R.; WEBER, C.J.; NILES, A.C. Comparative evaluation of three identification systems for anaerobes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.22, n.1, p.52-55, Jul. 1985.
137. MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM Press. 6.ed. 1995. 1482p.
138. MURRO, C.D.; PAOLANTONIO, M.; PEDRAZZOLI, V.; LOPATIN, D.E.; CATTABRIGA, M. An occurrence of *Porphyromonas gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, and *Treponema denticola* in periodontally health and disease subjects as determined by an Elisa Technique. **J. Periodontol.**, Chicago, v.68, n.1, p. 18-23, Jan. 1997.
139. NISHIHARA, T.; KOSEKI, T. Microbial etiology of periodontitis. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.36, n.1, p.14-26, Oct. 2004.
140. NONNENMACHER, C.; DALPKE, A.; MUTTERS, R.; HEEG, K. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. **J. Microbiol. Methods.**, v.59, n.1, p.117-125. Oct. 2004.
141. NONNENMACHER, C.; MUTTERS, R.; DE JACOBY, L.F. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. **Clin. Microbiol. Infect.**, Oxford, v.7, n.4, p.213-217, Apr. 2001.
142. NYMAN, S.; LINDHE, J. Exames em paciente com doença periodontal. In: LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap.12, p.271-280.
143. O'CONNOR, T.J.; SHAH, H.N.; KHO, P. Syntrophic association between *Bacteroides asaccharolyticus* and other oral bacteria. **Eur. J. Chemother. Antibiotics**, v.2, p.153-155, 1982.
144. OKADA, M.; HAYASHI, F.; NAGASAKA N. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.27, n.10, p.763-768, Oct. 2000.
145. OMATA, R.R.; DISRAELY, M.N. A selective medium for oral fusobacteria. **J. Bacteriol.**, Washington, v.72, n.5, p.677-680, Nov. 1956.
146. PAOLANTONIO, M., BONAVENTURA, G., PLACIDO, G., TUMINI, V., CATAMO, G., DONATO, A., PICCOLOMINI, R. Prevalence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and clinical conditions in children and

- adolescents from rural and urban areas of central Italy. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.27, n.8, p.549-557, Aug. 2000.
147. PAPANANOU, P.N.; MADIANOS, P.N.; DAHLÉN, G.; SANDROS, J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.105, n.5 (Pt 1), p.389-396, Oct. 1997.
  148. PAPANANOU, P.N. Risk assessments in the diagnosis and treatment of periodontal diseases. **J. Dent. Educ.**, v.62, n.10, p.822-839, Oct. 1998.
  149. PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E.; OLSEN, I.; FRASER, G.J. Phylogeny of *Bacteroides*, *Prevotella*, and *Porphyromonas* spp. and related bacteria. **J. Bacteriol.**, Washington, v.176, n.3, p.725-732, Feb. 1994.
  150. PASTER, B.J.; BOCHES, S.K.; GALVIN, J.L.; ERICSON, R.E.; LAU, C.N.; LEVANOS, V.A.; SAHASRABUDHE, A.; DWHERIST, F.E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **J. Bacteriol.**, Washington, v.183, n.12, p.3770-3783, Dec. 2001.
  151. PATTYN, S.R.; IEVEN, M.; BUFFET, L. Comparative evaluation of the Rapid ID 32A kit system, miniaturized standard procedure and a rapid fermentation procedure for the identification of anaerobic bacteria. **Acta Clin. Belg.**, Bruxelles, v.48, n.2, p.81-85, 1993.
  152. PEREA, E.J. La flora de la boca en la era de la biología molecular. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Sevilla, v. 9, Suppl. 1, p.1-10, 2004.
  153. PREUS, H.R.; SUNDAY, G.J.; HARASZTHY, V.I.; ZAMBON, J.J. Rapid identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* based on analysis of 23S ribosomal RNA. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.7, n.6, p.372-375. Dec. 1992.
  154. PREUS, H.R.; ZAMBON, J.J.; DUNFORD, R.G.; GENCO, R.J. The distribution and transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in families with established adult periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.65, n.1, p.2-7, Jan. 1994.
  155. QIU, Y.S.; KLITORINOS, A.; RAHAL. M.D.; SIBOO, R.; CHAN, E.C. Enumeration of viable oral spirochetes from periodontal pockets. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.9, n.5, p.301-304, Oct. 1994.
  156. RAMS, T.E.; FLYNN, M.J.; SLOTS, J. Subgingival microbial associations in severe human periodontitis. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago. v.25, Suppl.2, p.224-226, 1997.
  157. RAMS, T.E.; LISTGARTEN, M.A.; SLOTS, J. Utility of 5 major putative periodontal pathogens and selected clinical parameters to predict periodontal breakdown in patients on maintenance care. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, n.4, p.346-354, Apr. 1996.

158. RANNEY, R.R. Classification of periodontal diseases. **Periodontol.** **2000**, Munksgaard, v.2, n.1, p.13-25, June 1993.
159. RIGGIO, M.P.; LENNON, A. Rapid Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, and *Haemophilus paraprophilus* by Restriction Enzyme Analysis of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.35, n.6, p.1630-1632, June 1997.
160. RIGGIO, M.P.; MACFARLANE, T.W.; MACKENZIE, D.; LENNON, A.; SMITH, A.J.; KINANE, D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. **J. Periodontol. Res.**, Copenhagen, v.31, n.7, p.496-501, Oct. 1996.
161. RIVIERE, G.R.; SMITH, K.S.; CARRANZA, N.; TZAGAROULAKI, E.; KAY, S.L.; DOCK, M. Subgingival distribution of *Treponema denticola*, *Treponema socranskii*, and pathogen-related oral spirochetes: prevalence and relationship to periodontal status of sampled sites. **J. Periodontol.**, Chicago, v.66, n.10, p.829-837, Oct. 1995.
162. RIVIERE, G.R.; SMITH, K.S.; CARRANZA, N.J.R.; TZAGAROULAKI, E.; KAY, S.L.; DOCK, M.; ZHU, X.; DEROUEN, T.A. Associations between *Porphyromonas gingivalis* and oral treponemes in subgingival plaque. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 11, n.3, p.150-155, June 1996.
163. RODENBURG, J.P.; VAN WINKELHOFF, A.J.; WINKEL, E.G.; GOENE, R.J.; ABBAS, F.; DE GRAFF, J. Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. **J. Clin. Periodontol.**, Washington, v.17, n.6, p.392-399, Jul. 1990.
164. RODRIGUES, P.H.; CARVALHO, S.A.; COSTA, J.E.; CARVALHO, M.A.R.; FARIAS, L.M.; PETRILLO-PEIXOTO, M.L. Black-pigmented gram-negative anaerobes in Brazilian adults with periodontal disease. **Anaerobe**, v.5, n.3-4, p.267-268, June 1999.
165. ROGER, F.; ROGER, A.; CANIAUX, I. Evaluation of ATB 32 A system for automated identification of anaerobic bacteria. **Ann. Biol. Clin.**, Paris, v.49, n.1, p.14-17, 1991.
166. SAGLIE, F.R.; MARFANY, A.; CAMARGO, P. Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. **J. Periodontol.**, Chicago, v.59, n.4, p.259-265, Apr. 1988.
167. SAGLIE, R.; NEWMAN, M. G.; CARRANZA, F.A.; PATTISON, G. L. Bacterial invasion of gingiva in advanced periodontitis in humans. **J. Periodontol.**, Chicago, v. 53, n.4, p.217-222, Apr. 1982.

168. SAKAMOTO, M.; SUZUKI, M.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, L.; BENNO, Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1986) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.52, n.3, p.841-849, May 2002.
169. SANDROS, J.; PAPAPANOU P.N.; NANMARK, U.; DAHLEN, G. *Porphyromonas gingivalis* invades human pocket epithelium *in vitro*. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.29, n.1, p.62-69, Jan. 1994.
170. SAVITT, E.D.; SOCRANSKY, S.S. Distribution of certain subgingival microbial species in selective periodontal conditions. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.19, n.2, p.11-123, Mar. 1984.
171. SCHENKEIN, H.A.; BURMEISTER, J.A.; KOERTGE, T.E.; BROOKS, C.N.; BEST, A.M.; MOORE, L.V.; MOORE, W.E. The influence of race and gender on periodontal microflora. **J. Periodontol.**, Chicago, v.64, n.4, p.292-296, Apr. 1993.
172. SEIDA, K.; SAITO, A.; YAMADA, S.; ISHIHARA, K.; NAITO, Y.; OKUDA, K. A sensitive enzymatic method (SK-013) for detection of *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* and *Bacteroides forsythus* in subgingival plaque samples. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.27, n.2, p.86-91, Mar. 1992.
173. SHAH, H.N.; GHARBIA, S.E. Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v.42, n.4, p.542-546, Oct. 1992.
174. SHEIHAM, A.; NETUVELI, G.S. Periodontal diseases in Europe. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.29, n.1, p.104-121, Apr. 2002.
175. SHELBURNE, C.E.; SANDBERG, G.P.; BINSFELD, C.A.; WOLFF, L.F.; CURRY, R.D. Monoclonal antibodies to lipopolysaccharide of four bacteria associated with periodontal disease. **J. Periodont. Res.**, Copenhagen, v.28, n.1, p.1-9, Jan. 1993.
176. SHIBATA, Y.; FUJIMURA, S.; NAKAMURA, T. Purification and partial characterization of an elastolytic serine protease of *Prevotella intermedia*. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.59, n.7, p.2107-2111, Jul. 1993.
177. SIMONSON, L.G.; GOODMAN, C.H.; BIAL, J.J.; MORTON, H.E. Quantitative relationship of *Treponema denticola* to severity of periodontal disease. **Infect. Immun.**, Washington, v.56, n.4, p.726-728, Apr. 1988.
178. SIMONSON, L.G.; MCMAHON, K.T.; CHILDERS, D.W.; MORTON, H.E. Bacterial synergy of *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis* in a multinational population. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.7, n.2, p.111-112, Apr. 1992.

179. SIRINIAN, G.; SHIMIZU, T.; SUGAR, C.; SLOTS, J.; CHEN, C. Periodontopathic bacteria in young healthy subjects of different ethnic backgrounds in Los Angeles. **J. Periodontol.**, Chicago, v.73, n.3, p.283-288, Mar. 2002.
180. SLEE, A.M.; TANZER, J.M. Selective medium for isolation of *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. **J. Clin. Microbiol.** Washington, v.8, n.4, p.459-462, Oct. 1978.
181. SLOTS, J.; BRAGD, L.; WIKSTROM, M.; DAHLÉN, G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.13, n.6, p.570-577, Jul. 1986.
182. SLOTS, J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v.1, n.1, p.48-57, Nov. 1986.
183. SLOTS, J. Subgingival microflora and periodontal disease. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.6, n.5, p.351-382, Oct. 1979.
184. SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease: introduction. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.20, n.1, p.7-13, June 1999.
185. SLOTS, J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.15, n.4, p.606-609, Apr.1982.
186. SLOTS, J.; ASHIIMOTO, A.; FLYNN, M.J.; LI, G.; CHEN, C. Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.20, Suppl. 2, p.304-307, June 1995.
187. SLOTS, J.; LISTGARTERN, M.A. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.15, n.1, p.85-93, June 1988.
188. SLOTS, J.; FEIK, D.; RAMS, T.E. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.17, n.9, p. 659-662, Oct. 1990.
189. SLOTS, J.; GENCO, R.J. Microbial pathogenicity of black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. **J. Dent. Res.**, Washington, v.63, n.3, p.412-421, Mar. 1984.

190. SLOTS, J.; RAMS, T.E. Antibiotics in periodontal therapy; advantages and disadvantages. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.17, n.7, p.479-493, Jul. 1990
191. SLOTS, J.; REYNOLDS, H.S.; GENCO, R.J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. **Infect. Immun.**, Washington, v.29, n.3, p.1013-1020, Sept. 1980
192. SLOTS, J.; TING, M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment. **Periodontol. 2000**, Munksgaard, v.20, n.1, p.82-121, June 1999.
193. SOCRANSKY, S.S.; LOESCHE, W.J.; HUBERSAK, C.; MACDONALD, J.B. Dependency of *Treponema microdentium* on other oral organisms for isobutyrate, polyamines, and a controlled oxidation-reduction potential. **J. Bacteriol.**, Washington, v.88, p.200-209, Jul. 1964.
194. SOCRANSKY, S.S. Microbiology of periodontal disease present status and future considerations. **J. Periodontol.**, Chicago, v.48, n.9, p.497-504, Sept. 1977.
195. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, G.L.F.; DZINK, J.L. Difficulties encountered in the search for the etiologic agents of destructive periodontal diseases. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.14, n.10, p.588-593, Nov. 1987.
196. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE A.D., CUGINI, M.A., SMITH C., KENT JR, R.L. Microbial complexes in subgingival plaque. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.25, n.2, p.134-144, Feb. 1998.
197. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE A.D.; DZINK, J. L. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 15, n.7, p. 440-444, Aug. 1988.
198. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; SMITH, C.; DIBART, S. Relation of counts of microbial species to clinical status at the sampled sites. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 18, n.10, p.766-775, Nov. 1991.
199. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbiologia da doença periodontal In: Lindhe, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. Cap. 4, p.92-126.
200. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. Microbiological risk factors for destructive periodontal disease. In: BADER J.D. **Risk assessment in dentistry**. Chapel Hill: University of North Carolina Dental Ecology. 1990, p.79-90.
201. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **J. Periodontol.**, Chicago, v.63, Supl.4, p.322-331, Apr. 1992.

202. SOCRANSKY, S.S.; HAFFAJEE, A.D.; XIMENEZ-FYVIE, L.A.; FERES, M.; MAGER, D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. **Periodontol.** **2000**, Munksgaard, v.20, n.1, p.341-362, June 1999.
203. SÖDER, P.O.; JIN, L.J.; SODER, B. DNA probe detection of periodontopathogens in advanced periodontitis. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v.101, n.6, p.363-370, Dec. 1993.
204. STEVENS, R.H.; HAMMOND, B.F.; LAI, C.H. Characterization of an inducible bacteriophage from a leukotoxic strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. **Infect. Immun.**, Washington, v.35, n.1, p.343-349, Jan. 1987.
205. SUMMANEN, P.; BARON, E.J.; CITRON, D.M.; STRONG, C.A.; WEXLER, H.M.; FINEGOLD, S.M. **Wadsworth anaerobic bacteriology manual**. Los Angeles: Star Publishing Company, 1993, 230p.
206. SUTTER, V.L.; CITRON, D.M.; FINEGOLD, S.M. **Wadsworth anaerobic bacteriology manual**. St. Louis: Mosby Company, 1980. 131p.
207. SUZUKI, N.; YOSHIDA, A.; SAITO, T.; KAWADA, M.; NAKANO Y. Quantitative microbiological study of subgingival plaque by real-time PCR shows correlation between levels of *Tannerella forsythensis* and *Fusobacterium* spp. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.42, n.5, p.2255-2257, May 2004.
208. TAICHMAN, N.S., SHENKER, B.J., TSAI, C.C., GLICKMAN, L.T., BAEHNI, P.C., STEVENS, R., HAMMOND, B.F. Cytopathic effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on monkey blood leukocytes. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.19. n.2, p.133-145, Mar. 1984.
209. TAKAZOE, I.; NAKAMURA, T.; OKUDA, K. Colonization of the subgingival area by *Bacteroides gingivalis*. **J. Dent. Res.**, Washington, v.63, n.3, p.422-426, Mar. 1984.
210. TAKEUCHI, Y.; UMEDA, M.; ISHIZUKA, M.; HUANG, Y.; ISHIKAWA I. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Japanese population. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.10, p.1460-1469, Oct. 2003.
211. TANNER, A.C.; DZINK, J.L.; EBERSOLE, J.L.; SOCRANSKY, S.S. *Wolinella recta*, *Campylobacter concisus*, *Bacteroides gracilis* and *Eikenella corrodens* from periodontal lesions. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.22, n.4, p.327-330, Jul. 1987.
212. TANNER, A., MAIDEN, M.F.J., PASTER, B.J., DEWHIRST, F.E. The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria. **Periodontol.** **2000**, Munksgaard, v.5, n.1, p.26-51, June 1994.



213. TANNER, A.; BOULDIN, H. The microbiota of early periodontitis lesions in adults. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 16, n.7, p. 467-471, Aug. 1989.
214. TANNER, A.; MAIDEN, M.F.J.; MACUCH, P.J.; MURRAY, L.L.; KENT JR., R.L. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 25, n.2, p. 85-98. Feb. 1998.
215. TANNER, A.C.R.; HAFFER, C.; BRATTHALL, G.T.; VISCONTI, R.A.; SOCRANSKY, S.S. A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.6, n.5, p.278-307, Oct. 1979.
216. TEANPAISAN R.; DOUGLAS, C.W.; WALSH, T.F. Characterization of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites. **J. Periodontal. Res.**, Copenhagen, v.30, n.4, p.245-251, Jul. 1995.
217. TER STEEG, P.F.; VAN DER HOEVEN, J.S. Growth stimulation of *Treponema denticola* by periodontal microorganisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.57, n.2, p.36-70, Feb. 1990.
218. TINOCO, E.M.B. **Actinobacillus actinomycetemcomitans and localized Juvenile periodontitis in a disadvantaged Brazilian population; a clinical microbiologic and immunologic study.**, Oslo, 1998. Thesis – University of Oslo, Norway.
219. TINOCO, E.M.; BELDI, M.I.; LOUREIRO, C.A.; LANA, M.; CAMPEDELLI, F.; TINOCO, N.M.; GJERMO, P.; PREUS, H.R. Localized juvenile periodontitis and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in a brazilian population. **Eur. J. Oral Sci.**, Copenhagen, v.105, n.1, p.9-14, Feb. 1997.
220. TOLO, K.; SCHENCK, K. Activity of serum immunoglobulin G, A and M to six anaerobic oral bacteria in diagnosis of periodontitis. **J. Periodontal Res.**, Copenhagen, v.20, n.2, p.113-121, Mar. 1985.
221. TONETTI, M.S.; MOMBELLI, A. Early-onset periodontitis. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.4, n.4, p.39-52, Dec. 1999.
222. TONJUM T.; HAAS R. Identification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by leucotoxin gene-specific hybridization and polymerase chain reaction assays. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.31, n.7, p.1856-1859, Jul. 1993.
223. TRAN, S.D.; RUDNEY, J.D. Improved multiplex PCR using conserved and species-specific 16s rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus* and *Porphyromonas gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.37, n.11, p.3504-3508, Nov. 1999.

224. TRAN, S.D.; RUDNEY, J.D. Multiplex PCR using conserved and species-specific 16S rRNA gene primers for simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v.34, n.11, p.2674-2678, Nov. 1996.
225. UMEDA, M.; ISHIKAWA, I.; BENNO, Y.; MITSUOKA, T. Improved detection of oral spirochetes with an anaerobic culture method. **Oral Microbiol Immunol.**, Copenhagen, v.5, n.2, p.90-94, Apr. 1990.
226. UMEDA, M.; CHEN, C.; BAKKER, I.; CONTRERAS, A.; MORRISON, J.L.; SLOTS, J. Risk indicators for harboring periodontal pathogens. **J. Periodontol.**, Chicago, v.69, n.10, p.1111-1118, Oct. 1998.
227. VAN STEENBERGEN, T.J.M.; TIMMERMAN, M.F.; MIKX, F.H.M.; DE QUINCEY, G.; VAN DER WEIJDEN, G.A.; VAN DER VELDEN, U.; DE GRAAFF, J. Discrepancy between culture and DNA probe analysis for the detection of periodontal bacteria. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.23, n.10, p.955-959, Oct. 1996.
228. VAN WINKELHOFF, A.J.; KIPPUW, N.; GRAAFF, J. Cross-inhibition between black-pigmented *Bacteroides* species. **J. Dent. Res.**, Washington, v.66, n.11, p.1663-1667, Nov. 1987.
229. VAN WINKELHOFF, A.J.; VAN STEENBERGEN, T.J.M.; GRAAFF, J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.15, n.3, p.145-155, Mar. 1988.
230. VON TROIL-LINDÉN, B.; TORKKO, H.; ALALUUSUA, S.; WOLF, J.; JOUSIMIES-SOMER, H.; ASIKAINEN, S. Periodontal findings in spouses. A clinical, radiographic and microbiological study. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.22, n.2, p.93-99, Feb. 1995.
231. WAHLFORS, J.; MEURMAN, J.H.; VÄISÄNEN, P.; ALAKUIJALA, P.; KORHONEN, A.; TORKKO, H.; JÄNNE, J. Simultaneous detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* by a rapid PCR method. **J. Dent. Res.**, Washington, v.74, n.11, p.1796-1801, Nov. 1995.
232. WATANABE, K.; FROMMEL, T.O. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral plaque samples by use of the polymerase chain reaction. **J. Dent. Res.**, Washington, v.72, n.6, p.1040-1044, June 1993.
233. WATANABE, K.; FROMMEL, T.O. *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* detection in oral plaque samples using the polymerase chain reaction. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v.223, n.3, p.212-219, Mar. 1996.
234. WIEBE, C.B.; PUTNINS, E. E. The periodontal disease classification system of the American Academy of Periodontology-an update. **J. Can. Dent. Assoc.**, Ottawa, v. 66, n. 11, p. 594-597, Dec. 2000.

235. WILSON, M.; HENDERSON, B. Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* relevant to the pathogenesis of inflammatory periodontal diseases. **FEMS Microbiol. Rev.**, Amsterdam, v.17, n.4, p.365-379, Dec. 1995.
236. WYSS, C. Dependence of proliferation of *Bacteroides forsythus* on exogenous N-acetylmuramic acid. **Infect. Immun.**, Washington, v. 57, n.6, p. 1757-1759, June 1989.
237. WYSS, C.; CHOI, B.K.; SCHUPBACH, P.; GUGGENHEIM, B.; GOBEL, U.B. *Treponema maltophilum* sp. nov., a small oral spirochete isolated from human periodontal lesions. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v.46, n.3, p.745-752, Jul. 1996.
238. XIMÉNEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S. S. Comparison of the microbiota of supra-and subgingival plaque in health and periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n.9, p. 648-657, Sept. 2000.
239. YANO-HIGUCHI, K.; TAKAMATSU, N.; HE, T.; UMEDA, M.; ISHIKAWA, I. Prevalence of *Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in subgingival microflora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. **J. Clin. Periodontol.**, Copenhagen, v. 27, n. 8, p. 597-602, Aug. 2000.
240. YOSHIDA, A.; KAWADA, M.; SUZUKI, N.; NAKANO, Y.; OHO, T.; SAITO, T.; YAMASHITA, Y. TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for the correlation of *Treponema denticola* numbers with the severity of periodontal disease. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 19, n.3, p. 196-200, June 2004.
241. ZAMBON, J.J. Periodontal diseases: microbial factors. **Ann. Periodontol.**, Chicago, v.1, n.1, p.879-925, Nov.1996.
242. ZAMBON, J.J.; CHRISTERSSON, L.A.; SLOTS, J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. **J. Periodontol.**, Chicago, v.54, n.12, p.707-711, Dec. 1983.
243. ZAMBON, J.J.; HARASZTHY, V.I.; HARIHARAN, G.; LALLY, E.T.; DEMUTH, D.R. The microbiology of early-onset periodontitis: association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. **J. Periodontol.**, Chicago, v.67, n.3, p.282-290, Mar. 1996.

## 9 ANEXOS

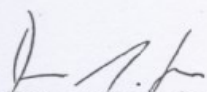
### Anexo I – Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa

UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de ética em pesquisa da UFMG - COEPParecer nº: ETIC 179/00  
Interessado: Prof. Luiz de Macêdo Farias

## VOTO:

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP aprova definitivamente no dia 17.01.2001 o projeto de pesquisa intitulado: «*Avaliação da Ocorrência de Periodontopatógenos em Sítios Periodontais de Seres Humanos por Métodos Microbiológicos e Moleculares*» e o Termo de Consentimento, do referido projeto, de interesse do Prof. Luiz de Macêdo Farias. O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
Prof. Dr. Dirceu Bartolomeu Greco  
Presidente do COEP

Av. Alfredo Balena, 110-1º andar  
Bairro Santa Efigênia - Cep: 30.130-100 - Belo Horizonte -MG  
Telefone: (031)- 248 9364  
F. X: (031) 248 9380 - Telex: (031) 2544  
e-mail: coep@reitoria.ufmg.br

**Anexo II - Termo de consentimento pós-informação para participação em pesquisa, conforme resolução número 196 de 10/10/96 do conselho nacional de saúde**

Título:

AVALIAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE PERIODONTOPATÓGENOS EM SÍTIOS PERIODONTAIS DE SERES HUMANOS POR MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS E MOLECULARES

Coordenador do Projeto:

Luiz de Macêdo Farias

Introdução:

Antes de aceitar participar desta pesquisa, é necessário que você leia e compreenda a explicação a seguir sobre os procedimentos propostos. Esta declaração esclarece o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e cuidados durante o estudo. Também descreve os procedimentos alternativos que estão disponíveis para você e o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo. Se você não for honesto com seu dentista em relação a suas queixas e história, você poderá prejudicar a você mesmo ao participar deste estudo.

Objetivos:

- Avaliar, pelo método de cultura microbiológica e por métodos moleculares, a presença de ***Porphyromonas gingivalis***, ***Prevotella intermedia***, ***Prevotella nigrescens***, ***Fusobacterium nucleatum***, ***Bacteroides forsythus***, ***Eikenella corrodens***, ***Actinobacillus actinomycetemcomitans*** e ***Treponema denticola*** em bolsas periodontais de pacientes portadores de periodontite do adulto ou periodontite de início precoce e em sulcos gengivais de pacientes sem manifestações clínicas de doença periodontal.
- Analisar as possíveis associações existentes entre os periodontopatógenos isolados dos pacientes com as diferentes entidades clínicas periodontais avaliadas.

Resumo:

Doenças periodontais, usualmente infecções bacterianas, se constituem em uma diversidade de alterações que acometem o periodonto, caracterizadas pela formação de bolsa periodontal, migração do epitélio juncional e destruição de tecido ósseo e conjuntivo. As infecções periodontais são as principais causas de destruição óssea alveolar e perda do elemento dental. Mais de 500 espécies de bactérias têm sido identificadas como colonizadores potenciais das placas supra e subgengival, podendo induzir resposta no hospedeiro e levar à inflamação no periodonto. Diferenças na composição da microbiota subgengival têm sido relacionadas a várias doenças periodontais. Estudos microbiológicos indicam que poucas bactérias anaeróbias e anaeróbias facultativas Gram negativas parecem estar associadas à doença e formação de bolsa periodontal. ***Porphyromonas gingivalis***, ***Fusobacterium nucleatum***, ***Eikenella corrodens***, ***Bacteroides forsythus***, ***Selenomonas sputigena*** e ***Prevotella intermedia***, entre outros, têm sido sugeridos como patógenos potenciais na doença periodontal do adulto, enquanto o ***Actinobacillus actinomycetemcomitans*** parece estar relacionado à etiologia da periodontite juvenil. Assim, considerando a relevância dos microrganismos na etiologia e patogênese das doenças periodontais, o reconhecimento do papel desses agentes é importante para se estabelecer uma real relação entre determinado grupo microbiano e entidades clínicas periodontais, podendo então se alcançar melhor diagnóstico, prognóstico e tratamento dessas infecções.

Procedimento:

Se você tem indicação para tratamento periodontal, você pode ser selecionado. Não serão incluídos no estudo, pacientes portadores de alterações sistêmicas, em uso de antimicrobianos e que tenham sido submetidos a tratamento periodontal recentemente. Caso você concorde em participar, um cone de papel absorvente será inserido na bolsa periodontal, por 60 segundos, e transferido, imediatamente, para solução de transporte. Utilizando cureta periodontal, a placa bacteriana subgengival será colhida, com leve raspagem, e transferida para solução de transporte.

Todos os resultados de exames que estiverem prontos estarão à sua disposição a qualquer momento da pesquisa.

Não haverá nenhum custo para você com sua inclusão no estudo.

Você não receberá qualquer remuneração pela participação na pesquisa.

Desconfortos:

O procedimento de colheita não gera nenhum desconforto.

Benefícios:

Sua participação será muito importante para o conhecimento da etiologia da infecção periodontal e poderá contribuir, no futuro, para a melhoria do controle da infecção e da saúde bucal.

Confidencialidade:

Os resultados serão mantidos em sigilo até onde é permitido pela lei. O Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição poderá verificá-los e ter acesso aos dados que identificam seu nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao concordar com sua participação, você autoriza o pesquisador a fornecer seus registros médicos para o órgão financiador, para a Instituição e para o Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

Desligamento:

Você poderá se afastar, a qualquer momento, sem prejuízo para o seu acompanhamento odontológico. O órgão financiador do estudo (se houver) poderá finalizar a sua participação nesta pesquisa por falta de recursos por parte do financiador ou por não preenchimento de critérios de inclusão por parte do paciente.

Novas descobertas:

Todos os novos dados desta pesquisa serão fornecidos a você.

Contato com o pesquisador:

Pode ser feita pelo telefone 3499 2743. Caso tenha alguma dúvida sobre os seus direitos como paciente de pesquisa, você deverá ligar para o presidente do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG no número 3248 9364.

Consentimento:

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Estou participando voluntariamente desta pesquisa, até que eu decida o contrário.

Belo Horizonte, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Nome do paciente:

RG:

Endereço:

Idade:

Testemunhas

---

Nome:

RG:

Endereço:

---

Nome:

RG:

Endereço

## Anexo III – Ficha Clínica

**FICHA CLÍNICA****N ° -**

Nome: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_

## História médica :

Alterações sistêmicas: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Tratamentos anteriores: \_\_\_\_\_

Alergias: \_\_\_\_\_

Enfartamento ganglionar: \_\_\_\_\_ Edemas: \_\_\_\_\_

Uso de medicamento: \_\_\_\_\_

Uso de antibiótico: \_\_\_\_\_ Quanto tempo: \_\_\_\_\_

Fumante: \_\_\_\_\_ Quanto tempo: \_\_\_\_\_

Tratamento periodontal anterior: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Diagnóstico periodontal atual: \_\_\_\_\_

**Sondagem**

Dente	Facies				Dente	Facies			
	M	D	P/L	V		M	D	P/L	V

Sítios coletados: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_\_\_

Local da coleta: \_\_\_\_\_

Professor responsável: \_\_\_\_\_

Obs.:

---



---



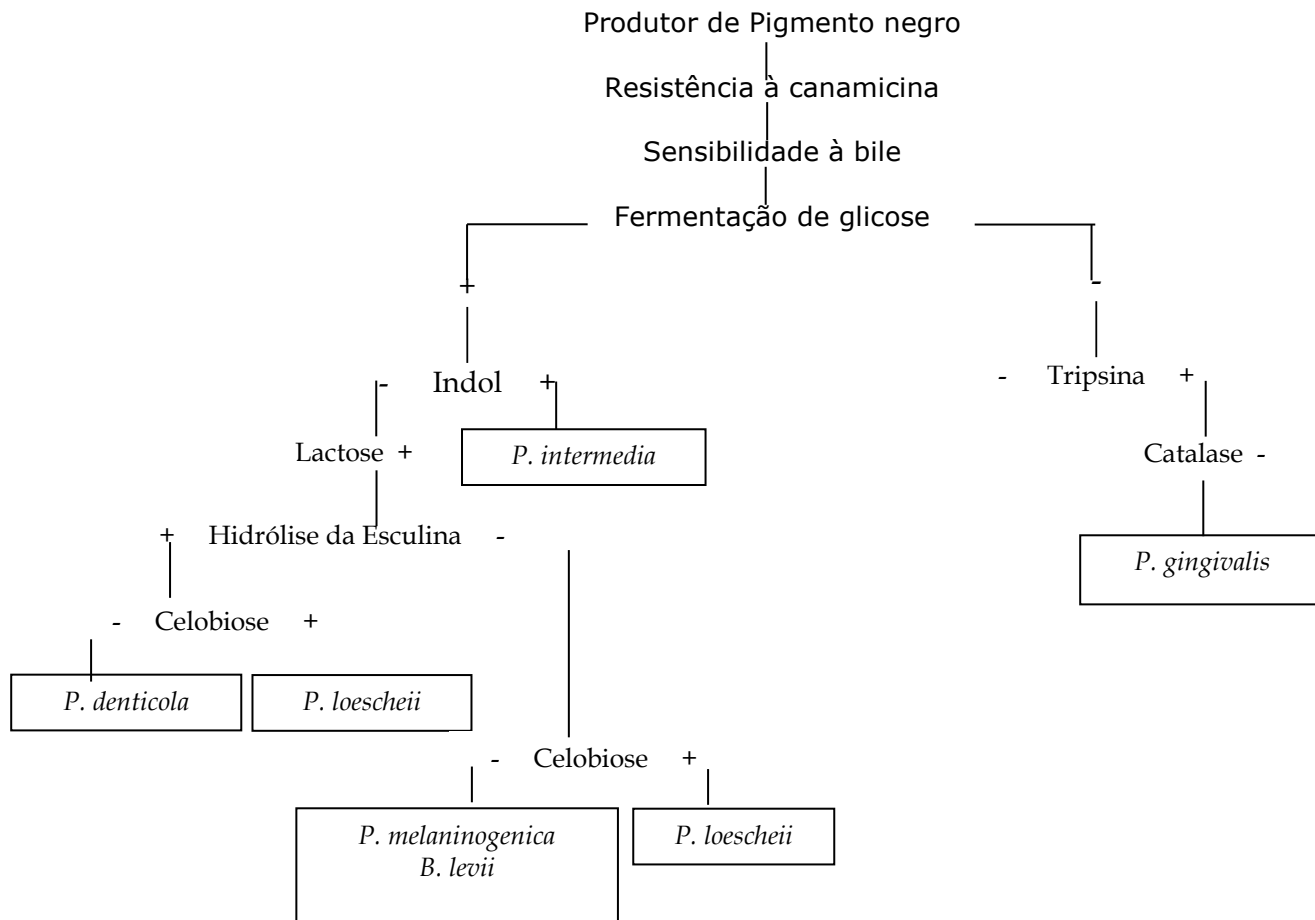
---



---

## Anexo IV - Chaves de identificação dos microrganismos

## • Bactérias Produtoras de Pigmento Negro



Amostra	Indol	Lipase	Vancomicina	Catalase	Tripsina	Esculina	Fermentação			
							Glicose	Lactose	Sacarose	Celobiose
<i>P. asaccharolytica</i>	+	-	S	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. endodontalis</i>	+	-	S	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. gingivalis</i>	+	-	S	-	+	-	-	-	-	-
<i>P. denticola</i>	-	-	R	-	-	+	+	+	+	-
<i>P. intermedia</i>	+	+/-	R	-	-	-	+	-	+	-
<i>P. loescheii</i>	-	V	R	-	-	V	+	+	+	+
<i>P. melaninogenica</i>	-	-/+	R	-	-	-	+	+	+	-



- *Fusobacterium*

Teste respiratório - Anaeróbico obrigatório

|

Resistência à vancomicina

|

Sensibilidade à colistina e à canamicina

Amostra	Indol	Bile	H <sub>2</sub> S	Esculina	Lipase
<i>F. alocis</i>	-	S	-	-	-
<i>F. mortiferum</i>	-	R	+	+	-
<i>F. naviforme</i>	+	S	+	-	-
<i>F. necrophorum</i>	+	-/+	+	-	+
<i>F. nucleatum</i>	+	S	+/-	-	-
<i>F. periodonticum</i>	+	S	+	-	-
<i>F. pseudonecrophorum</i>	+	R	+	-	-
<i>F. russii</i>	-	S	-/+	-	-
<i>F. simiae</i>	+	R	+	-	-
<i>F. sulci</i>	-	S	-	-	-
<i>F. varium</i>	v	R	+	-	v

Amostra	Fermentação							
	Glicose	Galactose	Manose	Frutose	Lactose	Sacarose	Trealose	Rafinose
<i>F. alocis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. mortiferum</i>	+ / F	-	+ / F	+ / F	+ / F	+ / F	- / +	+ / F
<i>F. naviforme</i>	F / -	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. necrophorum</i>	- / F	-	-	- / F	-	-	-	-
<i>F. nucleatum</i>	- / F	-	-	- / F	-	-	-	-
<i>F. periodonticum</i>	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>F. pseudonecrophorum</i>	F	-	-	F	-	-	-	-
<i>F. russii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. simiae</i>	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>F. sulci</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>F. varium</i>	F / +	- / F	F / +	F / +	-	-	-	-

- *Actinobacillus actinomycetemcomitans*

Teste respiratório - Microaerófilo / capnófilo

Catalase	Oxidase	Esculina	H <sub>2</sub> S	NaF 10µg/ml	NaF 100µg/ml	Glicose	Sacarose	Trealose	Lactose
+	-	-	-	R	S	+	-	-	-

- *Eikenella corrodens*

Teste respiratório - Microaerófilo / capnófilo

Fermentação de Sacarose	Hidrólise da Esculina	Catalase	Oxidase	Indol
-	-	-	+	-

**Anexo V - Testes Enzimáticos e Bioquímicos - Sistema Rapid ID 32 A**

Urease

Arginina Di-hidrolase

$\alpha$  Galactosidase

$\beta$  Galactosidase

$\beta$  Galactosidase 6 fosfato

$\alpha$  Glucosidase

$\beta$  Glucosidase

$\alpha$  Arabinosidase

$\beta$  Glucuronidase

$\beta$  N-Acetil-Glucosaminidase

Fermentação de manose

Fermentação de rafinose

Ácido glutâmico Decarboxilase

$\alpha$  Fucosidase

Redução de nitratos

Produção de indol

Fosfatase alcalina

Arginina Arilamidase

Prolina Arilamidase

Leucil Glicina Arilamidase

Fenilalanina Arilamidase

Leucina Arilamidase

Ácido Piroglutâmico Arilamidase

Tirosina Arilamidase

Alanina Arilamidase

Glicina Arilamidase

Histidina Arilamidase

Glutamil Ácido Glutâmico Arilamidase

Serina Arilamidase