

Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte



Importância do Diagnóstico Microbiológico na Terapia da Doença Periodontal

JOSÉ LOPES DE SÁ

Gandra 2010

Instituto Superior de Ciências da Saúde – Norte



Importância do Diagnóstico Microbiológico na Terapia da Doença Periodontal

JOSÉ LOPES DE SÁ

Dissertação apresentada ao Instituto Superior de Ciências da Saúde-Norte,
para obtenção do grau de Mestre em Periodontologia

Orientador: Professora Doutora Corsina Velazco Henriques

Gandra, 2010

À Clara e à Joana

Agradecimentos

Desejo exprimir o meu mais sincero reconhecimento a todas as pessoas que das mais diversas formas tornaram possível a realização deste trabalho, em particular:

À Professora Doutora Corsina Velazco Henriques, orientadora científica desta dissertação, pelo interesse e incentivo manifestados desde o primeiro momento, pela cedência de material científico e elementos bibliográficos, pelo entusiasmo com que acompanhou as diferentes etapas da realização do trabalho bem como a sua total disponibilidade e amizade com que me ajudou a concluí-lo.

Aos docentes do Mestrado, responsáveis pela aquisição de conhecimentos práticos, pela dedicação, transmissão do saber acumulado, partilha de experiências e pelo incentivo em progredir e sobretudo pelos laços de amizade.

À direcção da Clínica Dentária da Avenida e aos seus funcionários em especial à Andrea Dagot, pela total abertura para a realização deste projecto, companheirismo e incentivo para sua rápida conclusão.

Às funcionárias do laboratório de microbiologia, D^a Teresinha Ferreira e Patrícia Pacheco pela boa vontade paciência e simpatia demonstrada.

Ao meu pai pela inestimável boa vontade na correcção de algumas frases menos conseguidas e pela sua sempre atenta correcção do bom português.

À Clara e Joana, pela confiança e incentivo, pelo apoio incondicional e pela ajuda preciosa, desejando deixar mais de que o agradecimento um pedido de desculpas por todo tempo que não foi possível partilhar.

INDÍCE

Agradecimentos

Resumo	I
Abstract	IV
Palavras-chave	VII
I - Introdução	1
II - Revisão bibliográfica	4
1 - Vírus mediadores da destruição das defesas do hospedeiro	9
2 - Patogenicidade das bactérias periodontopáticas	10
3 - Antibióticos	12
3.1- Amoxicilina	12
3.2- Tetraciclina	12
3.3- Metronidazol	14
3.4- Ciprofloxacina	15
4 - Qual o antibiótico adequado?	17
5 - Qual é a atmosfera ideal dos microorganismos periodontais ?	19
6 - Importância do diagnóstico microbiológico e do antibiótico a seleccionar	20
6.1 - Como devemos seleccionar um antibiótico?	22
7 - Microbiota periodontal	23
8 - Resistência bacteriana	25

8.1 - Resistência natural	25
8.2 - Resistência adquirida	25
8.3 - Mecanismos de resistência	26
8.4 - O uso de antibióticos e o desenvolvimento de resistências	27
III - Objectivos do estudo	29
IV - Material e Métodos	30
1- Caracterização da amostra	30
2- Avaliação clínica	31
2.1 -Anamnese	31
2.2 - Profundidade do sulco	31
2.3- Quantificação da perda de aderência	32
2.4 - Quantificação do índice de sangramento à sondagem	32
2.5 - Quantificação de placa	32
2.6 - Perda de osso alveolar	33
2.7 - Quantificação da mobilidade dentária	33
2.8 - Recessão gengival	33
2.9 - Diagnóstico Clínico	34

3 - Colheitas	34
3.1- Sítio da Colheita	34
3.2- Técnicas de colheita das amostras	34
3.3- Transporte de amostras	35
3.4 - Meio transporte	35
4- Observação microscópica directa da amostra	36
4.1- Coloração de Gram	36
4.2- Coloração de Vagô	36
5- Cultura	37
5.1- Dispersão da amostra	37
5.2 - Diluição em série	37
5.3- Meios de cultura	39
5.3.1 - Meio não selectivo, enriquecido BA	39
5.3.2 - Meio selectivo TSBV	39
5.3.3 - Meio selectivo TGYKV	39
5.3.4 - Sementeira	40
5.3.5 - Incubação em atmosfera com 10% de CO ₂	41
5.3.6 - Incubação em anaerobiose	41

6. Testes presuntivos utilizados para a identificação das bactérias	42
6.1 – Catalase	42
6.2 – Oxidase	42
6.3 - Fluorescência em UV	42
6.4 – CAAM	42
6.5 – MUG	42
6.6 - Observações microscópicas	42
6.7 - Colorações Diferenciais	43
7. Determinação da sensibilidade aos antibióticos das estirpes	43
V - Resultados	46
1 - Idade, género e hábitos tabágicos	46
2 - Tipos de periodontites e complexos bacterianos	48
3 - Sensibilidade aos antibióticos	51
3.1- Sensibilidade	51
3.2- Sensibilidade intermédia	54
3.3- Resistência	55
VI - Discussão	56
VII - Conclusões	68
VIII - Bibliografia	70

Índice de figuras

Figura 1 – Diagrama elucidativo da aderência bacteriana à superfície dentária	5
Figura 2 – Complexos de Socransky	6
Figura 3 – Ecologia microbiana da placa subgengival	9
Figura 4 – Relação entre desordens orgânicas e Periodontopáticas	11
Figura 5 – Representação do efeito genético e ambiental na interrelação bactéria - hospedeiro - habitat e tratamento	23
Figura 6 – Ecologia microbiana da placa subgengival	24
Figura 7 – Meio de transporte	37
Figura 8 – Diluição em série	38
Figura 9 – Sementeira	40
Figura 10 –Jarra Gaspak com ambiente anaeróbio para crescimento bacteriano	41
Figura 11 – Teste de sensibilidade (E-test) frente aos antibióticos: Procedimentos	44
Figura 12 – E-test de <i>Aa</i> frente a 5 antibioticos e <i>Capno</i> respectivamente	45
Figura 13 –Representação etária da amostra	46
Figura 14 –Representação do género em percentagem	47
Figura 15 –Representação de hábitos em percentagem	47

Figura 16 – Bactérias periodontopáticas sensíveis aos 5 antibióticos	53
Figura 14 – Sensibilidade Intermédia das bactérias periodontopáticas aos 5 antibióticos	54
Figura 16 – Bactérias periodontopáticas resistentes frente aos 5 antibióticos	55

Índice de tabelas

Tabela I – Mecanismos de resistência dos principais antibióticos usados em periodontologia	27
Tabela II – Descrição dos pacientes	30
Tabela III – Composição do meio VMGA III	36
Tabela IV – Controlo do CMI, E-TEST com cepas de referencia	45
Tabela V – Apresentação das amostras e tipo de periodontite	48
Tabela VI – Relação entre tipo de periodontite e bactérias periodontopáticas	49
Tabela VII – Relação de complexos bacterianos, grupo etário e tipo de periodontite	50
Tabela VIII – Tipos de Periodontite e a sua relação com espécies bacterianas patogénicas	51
Tabela IX – Determinação da CMI de 5 antibióticos frente às bactérias	52

Abreviaturas

Aa. Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Pg. Porphyromonas gingivalis

Pi. Prevotella intermédia

Campyl. Campylobacter sputorum

Tf. Tannarella forsythia

Cr Campylobacter rectus

En. Eubacterium nodatum

Fn. Fusobacterium nucleatum

Mm. Micromonas micros

Pn. Prevotella nigrescens

Dp. Dialister pneumosyntes

Capnocytophaga gingivalis

Si. Streptococcus intermedius

CMI. Concentração mínima inibitória

PAG. Periodontite agressiva generalizada

PAL. Periodontite agressiva localizada

PCG. Periodontite crónica generalizada

Resumo

A Medicina Dentária na sua função de prevenção, tratamento e estética depara-se com a transposição do obstáculo conhecido como doença periodontal.

O objectivo deste estudo é contribuir para o esclarecimento da origem desta doença através da pesquisa micro biológica e dos seus agentes etiológicos.

O seu tratamento que entre outros parâmetros inclui a placa bacteriana, ou biofilme foi motivo de interesse da Medicina Dentaria desde há mais de um século, tendo surgido conseqüentemente a hipótese da placa bacteriana não específica, que se entendia ter o envolvimento de um conjunto de bactérias, hipótese esta que foi modificada paulatinamente através do tempo com o lançamento da hipótese específica, baseada no envolvimento de um conjunto de espécies bacterianas com características bem definidas.

Os avanços actuais, na metodologia de isolamento e identificação, assim como na determinação da virulência destas bactérias, têm permitido elucidar com clareza a importância e o papel que elas tem na patologia da doença. Porém, há ainda muitos estudos a serem explorados relativamente ligados às espécies classicamente identificadas e com importância pelo seu valor patogénico.

O propósito deste trabalho foi:

a) Avaliar a presença de bactérias periodontopáticas nos diferentes tipos de periodontite.

b) Determinar a concentração mínima inibitória utilizando o método Épsilon teste.

Nesta perspectiva, foi realizado um estudo clínico-microbiológico de indivíduos com diagnóstico de periodontite, seguidos numa clínica privada.

O estudo compreendeu 15 amostras provenientes de 15 indivíduos nos quais foram avaliados os seguintes parâmetros clínicos: sangramento, índice de placa bacteriana, profundidade de sondagem, recessão gengival, nível de inserção clínica, mobilidade e realização de radiografias pela técnica do cone longo. A partir destes dados foi efectuada a classificação do tipo de periodontite baseada na descrição feita por Armitage³.

As colheitas foram realizadas como preconizam diversos autores, isto é, introduzindo diversas pontas de papel em cada local de lesão periodontal. A identificação de bactérias responsáveis pela infecção foi realizada através dos métodos convencionais de cultura, propondo-se também realizar testes de susceptibilidade das bactérias isoladas, frente aos antibióticos através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI).

O estudo bacteriológico compreendeu a observação microscópica directa da amostra utilizando dois métodos de coloração, Gram e a visualização de espiroquetas (*Treponema* spp) foi feita através da coloração de Vagô.

Com o intuito de contribuir na orientação do tratamento, foi estudada a susceptibilidade das bactérias patogénicas isoladas, utilizando o método de Concentração Mínima Inibitória (CMI). O critério da selecção de antibióticos baseou-se nos hábitos terapêuticos mais comumente recomendados. Assim incluiu-se, a amoxicilina, a amoxicilina mais o ácido clavulânico, o metronidazol, a tetraciclina e a ciprofloxacina. Os resultados revelaram que havia associações complexas de bactérias nos casos estudados. Encontrou-se a presença de *Aa.* em 5 casos estudados e quatro

destes corresponderam a formas de periodontite generalizada agressiva. Notou-se a presença de *Campylobacter sputorum* em 6 casos de periodontite generalizada crónica, associados a bactérias periodontopáticas, particularmente a *Prevotella intermédia* e a *Porphyromona gingivalis*.

No que concerne à susceptibilidade bacteriana encontrada frente aos antibióticos é de realçar a multiresistência das espécies *Pi*, *Campylobacter sputorum* e também *Capnocytophaga* spp. Despertou-nos também a atenção a resistência dessas espécies à ciprofloxacina e ao metronidazol em associação. As bactérias periodontopáticas encontradas, reunidas em complexos bacterianos indicam formação de placa bacteriana em estado de Biofilme e foram compatíveis com os tipos de periodontite diagnosticados.

A maior parte de cepas bacterianas periodontopáticas testadas, foram sensíveis aos antibióticos usados frequentemente no tratamento periodontal. No entanto, foram detectadas espécies com forte tendência à resistência, tais como *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Campylobacter* spp., e *Capnocytophaga*.

Abstract

Dentistry in its role for prevention, treatment and aesthetics, stands before an obstacle known as periodontal disease.

The purpose of this study is to contribute to clarifying the origin of periodontal disease through microbiological research and its etiological agents.

Periodontal disease treatment, that includes, among other parameters dental plaque or biofilm has been a cause of interest in dentistry for over a century, and thus the emerge of the nonspecific plaque hypothesis, which was understood to have the involvement of a wide range of bacteria, a hypothesis which gradually changed over time with the release of specific hypothesis, based on the involvement of a number of bacterial species with well defined characteristics.

The current advances in the methodology for the isolation and identification, as well as in determining the virulence of these bacteria have allowed elucidating the importance and the role they have in the pathology of the disease. But there are still many studies to be exploited concerning the classically identified species with important pathogen value.

The purpose of this study was:

- a) assess the presence of periodontopathic bacteria in different types of periodontitis.
- b) Determine the minimum inhibitory concentration method using Epsilon test.

In this perspective, we performed a clinical and microbiological study of subjects diagnosed with periodontitis, followed by a private practice clinic.

The study included 15 samples from 15 individuals where several

clinical parameters were evaluated: bleeding index, plaque index, probing depth, gingival recession, clinical attachment level, mobility and attainment of the radiographs using long cone technique.

Considering these data, each type of periodontitis, was classified according the periodontitis description made by Armitage.

The measurements were performed as recommended by several authors, i.e., introducing several paper tips at each location of the periodontal lesion. Identification of bacteria responsible for infection was performed using conventional methods of culture, and we also proposed to perform susceptibility testing of isolates, compared to antibiotics by determining the minimum inhibitory concentration (MIC).

The bacteriological study consisted of direct microscopic observation of the sample using two methods of staining, Gram and visualization of spirochetes (*Treponema* spp) was confirmed by Vago staining. Aiming to contribute in guiding treatment, we studied the susceptibility of pathogenic bacteria isolated using the method of Minimum Inhibitory Concentration (MIC).

The criterion for the selection of antibiotics was based on the most commonly recommended therapeutic habits. So we included amoxicillin, amoxicillin plus clavulanic acid, metronidazole, tetracycline and ciprofloxacin.

Results revealed complex bacterial associations in the studied cases. It was found in 5 cases the presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and four of these corresponded to the form of widespread aggressive periodontitis. It was noted the presence of *Campylobacter sputorum* in 6 cases of chronic widespread periodontitis

associated with periodontopathic bacteria, particularly *Pg.* and *Pi.* The bacterial susceptibility to antibiotics and enhance the multi resistant species *Prevotella intermedia* as well as *Campylobacter sputorum.* awakened us also to become conscious of the resistance of these species to ciprofloxacin and metronidazole in combination. The periodontopathic bacteria found, clustered in bacterial complex, indicate the formation of plaque in a state of biofilm and were reliable with the types of periodontitis diagnosed.

Most periodontopathic bacterial strains tested were sensitive to antibiotics commonly used in periodontal treatment. However, some species were detected with a strong tendency to resistance, such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* , *Campylobacter* spp., and *Capnocytophaga* spp.

Palavras-chave

Doenças periodontais

Estudo clínico

Bactérias periodontopatogénicas

Sensibilidade aos antibióticos

I - Introdução

As estruturas dentárias são órgãos integrados no sistema digestivo e estão implantados nos arcos alveolares da maxila e mandíbula tendo por função essencial a mastigação, cortando, moendo e misturando os alimentos ingeridos⁴. A integridade desta estrutura é importante no contexto da saúde oral e portanto no estado global do organismo humano. Mantê-la íntegra é um dos objectivos do Médico Dentista por dever profissional e satisfação dos pacientes. Nem sempre esta situação ideal se mantém. Há vários factores que contribuem para a degradação da saúde oral e entre eles o mais frequente é a má higiene oral.

O termo “doença periodontal” define várias patologias associadas ao periodonto⁵. Trata-se de uma morbilidade que afecta as estruturas de suporte dos dentes nomeadamente: o ligamento periodontal, o cemento, o osso alveolar, a gengiva, e nos implantes, as suas estruturas de suporte⁶. Afecta virtualmente a maioria da população mundial, sendo a maior causa de perda de dentes após os 25 anos de idade⁷.

Tem sido demonstrado que a doença periodontal é causada por acumulação de componentes microbianos que constituem a placa bacteriana madura, ou em estado de biofilme, localizada no interior das áreas subgengivais do periodonto^{8 9}.

A doença periodontal compreende as gengivites e as periodontites. A gengivite cursa frequentemente como um estado leve da doença periodontal e que apresenta sinais inflamatórios às vezes com sangramento¹⁰. Na periodontite há progressão da doença inicial em profundidade com destruição da inserção de tecido conjuntivo ao cemento, reabsorção de osso alveolar e aumento da mobilidade dentária até finalizar com a queda dentária¹¹.

A doença periodontal é provavelmente uma das patologias infecciosas mais frequentes das estruturas orais. Tem uma evolução crónica com algumas etapas de agudização, progredindo a um ritmo variável em cada caso.

A doença periodontal é causada por um grupo de bactérias relativamente restrito, actuado isoladamente ou em combinação. As espécies mais comuns são: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa), *Tannarella forsythia* (Tf), *Campylobacter rectus* (Cr), *Eubacterium nodatum* (En), *Fusobacterium nucleatum* (Fn), *Peptostreptococcus micros* (Pm), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Prevotella intermédia* (Pi), *Prevotella nigrescens* (Pn), *Streptococcus intermedius* (Si) e *Treponema* sp¹²⁻¹⁴.

A etiologia da doença periodontal é a placa bacteriana. A sua progressão está relacionada com dois aspectos intervenientes a considerar: por um lado a susceptibilidade do indivíduo frente ao agente infeccioso e por outro as características de ordem genética relacionadas com indivíduo. Do ponto vista bacteriológico, as causas de doença periodontal podem ser diferenciadas. Relativamente a este assunto foram formuladas várias hipóteses que distinguem dois conceitos:

i) O da hipótese não específica envolvendo geralmente gengivites e um número heterogéneo de espécies bacterianas.

ii) O da hipótese específica que se refere à presença de um número restrito de espécies bacterianas^{15, 16}.

Estas bactérias além de estar envolvidas nestas infecções caracterizam-se por serem transmissíveis, como está demonstrado através de estudos epidemiológicos¹⁷.

Há um percurso específico de ocorrência das infecções na cavidade oral em relação a faixas etárias. Assim, as cáries ocorrem geralmente até ao fim da

fase escolar, ao contrário das doenças periodontais que surgem na idade adulta, predominantemente, entre 35 e 60 anos¹⁸.

As técnicas tradicionais de tratamento e prevenção destas patologias periodontais baseiam-se em procedimentos de limpeza, destartarização e curetagem para reduzir a acumulação de placa bacteriana e o uso de irrigantes^{15, 19}. Outra abordagem do tratamento é a de utilização de antibióticos sendo uma conduta frequente com intuito também de prevenção. No entanto, por vezes, faz com que a sua utilização seja de maneira indiscriminada e nem sempre orientada à eliminação do agente microbiológico o que pode ainda agravar o processo infeccioso.

Nos últimos tempos tem-se demonstrado a repercussão da doença periodontal, como foco infeccioso, nas áreas próximas podendo envolver a mucosa oral, assim como a projecção, à distância, a diversos órgãos e sistemas. Neste sentido, a utilização dos antibióticos poderia ser adequada e conveniente na prevenção de infecções mais graves como, por exemplo, as cardiovasculares²⁰⁻²³.

Deveremos ter em conta uma série de considerações quando escolhermos um antibiótico, tais como: a selecção do paciente, o diagnóstico microbiológico, o antibiótico de primeira eleição, a sensibilidade microbiana, a sinergia de antibióticos, a dose e o tempo do tratamento²⁴⁻²⁶.

É de salientar o aumento progressivo da resistência bacteriana pelo uso indiscriminado dos antibióticos. Os microorganismos são elementos vivos, dinâmicos, portanto, sujeitos a mudanças de adaptação envolvendo características genóticas com expressão fenotípica. A utilização não criteriosa na clínica de certos antibióticos no tratamento das periodontites, está a contribuir para a selecção de estirpes resistentes, o que nos deve manter sempre alerta^{27, 28}.

Do ponto de vista bacteriológico, várias metodologias laboratoriais foram estudadas. Até estabelecer as condições ideais de isolamento e identificação, por métodos convencionais, muitos trabalhos foram realizados por alguns autores, Slots et al, tiveram um contributo determinante na identificação dos agentes etiológicos envolvidos na doença periodontal. Mais tarde, com os avanços das metodologias moleculares introduziu-se a técnica da reacção de “Polymerase chain reaction” (PCR), para obter resultados mais rápidos em números mais elevados de amostras, na detecção destes agentes.

O estudo utilizou, no processamento das amostras, o método convencional, preconizado pelos autores que originalmente o introduziram, permitindo de uma forma abrangente visualizar a flora cultivável, presente na amostra, assim como, também identificar as bactérias patogénicas^{29, 30}.

A introdução de testes de susceptibilidade aos antibióticos foi outro dos objectivos deste trabalho. Apesar da relevância na determinação da susceptibilidade das bactérias periodontopáticas, são muitos os aspectos por standardizar, nomeadamente, no que respeita à reprodução de metodologias, considerando a dificuldade da viabilidade destas bactérias.

II - Revisão bibliográfica

A doença periodontal caracteriza-se por processos imuno-inflamatórios nos tecidos que circundam o dente e é um processo interactivo entre o biofilme dental e os tecidos periodontais.

O biofilme oral, anteriormente denominado placa dentária bacteriana, é uma comunidade cooperativa e estruturada de microorganismos, instalada numa matriz constituída por polímeros extra celulares produzidos pelas próprias bactérias aderidas a uma superfície que

pode ser tanto de tecidos duros tais como: o esmalte do dente, o cimento e a dentina, como de tecidos moles (língua).

O biofilme oferece uma grande protecção às bactérias, inclusive contra os antimicrobianos. Está organizado em complexas comunidades de numerosas espécies bacterianas dentro de um especializado ecossistema. Forma-se quando a bactéria se adere à superfície, num ambiente aquoso, e secreta substâncias mucosas que se ligam às estruturas dentárias, tecidos, ou diversos materiais utilizados nos tratamentos dentários^{31, 32}.

A localização do biofilme nas estruturas dentárias é determinante. As superfícies supragengivais dos dentes, expostas ao ambiente, banhadas pela saliva e sujeitas a contínua escamação, são constituídas por bactérias anaeróbicas facultativas, ao contrário das superfícies subgengivais, mais protegidas do meio externo, criando condições ideais para a instalação de bactérias anaeróbicas estritas.

As bactérias, componentes do biofilme, são capazes de responder rapidamente às mudanças do seu ambiente tais como: a temperatura elevada que caracteriza uma reacção inflamatória e ou as mudanças genéticas que se expressam como determinantes no grau de virulência ou aquisição de resistência frente aos antibióticos ou a outros agentes químicos^{14, 33}.

A quantidade de antimicrobianos requerida para afectar células no biofilme é significativamente maior, 1000 a 1500 vezes, do que a quantidade requerida para inibir células bacterianas planctónicas, termo utilizado para as bactérias que vivem livremente em culturas puras e que portanto não requerem suporte para crescer^{2, 34, 35}. Utilizando modelos de biofilme subgengival foi verificado que algumas cepas bacterianas foram resistentes a doses de 2mg/ml de tetraciclina (2000µg/ml)³⁶.

As bactérias em estado de biofilme tornam-se resistentes às defesas do hospedeiro por várias características de virulência como por exemplo a

sua toxicidade. Por outro lado, o biofilme pode facilitar o processo de aporte de nutrientes entre elas por entre cruzamento bacteriano³⁴.

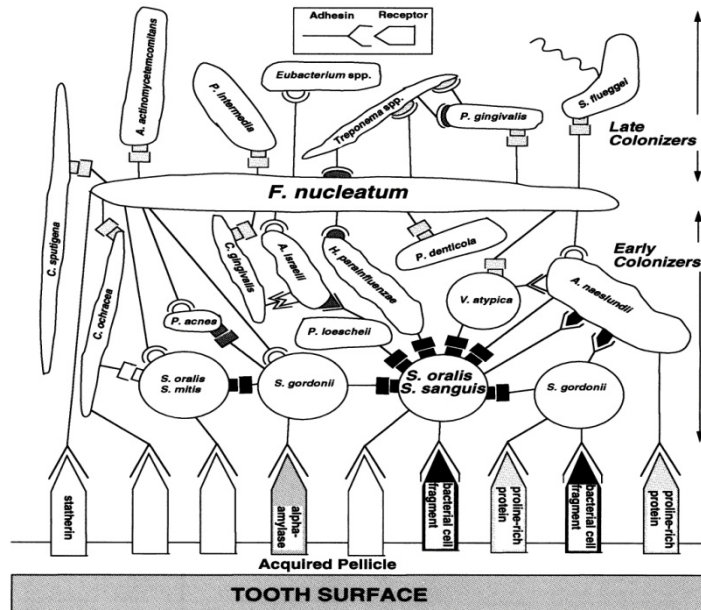


Figura 1-Diagrama elucidativo da aderência bacteriana à superfície dentária, P. E. KOLENBRANDER¹.

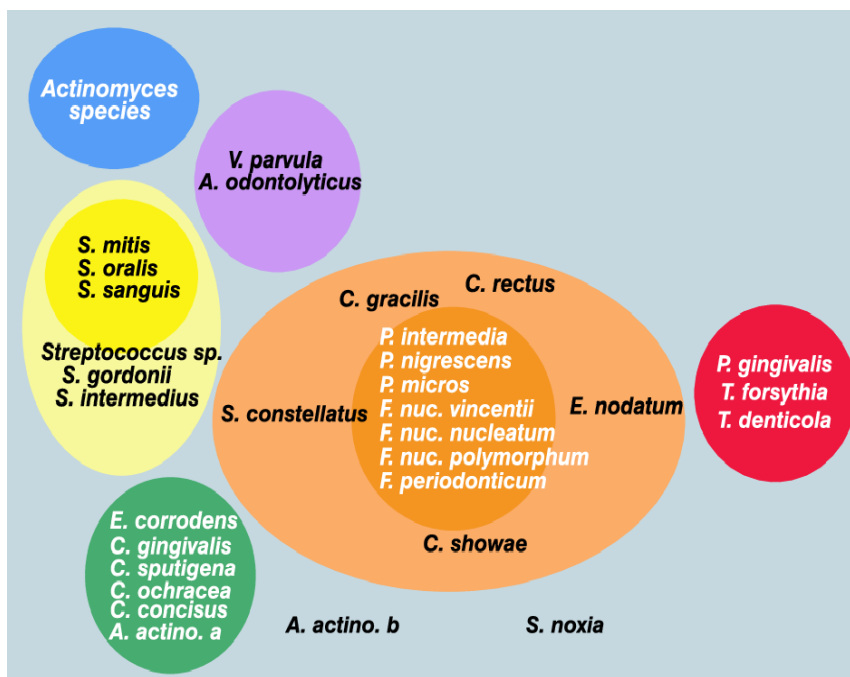


Figura 2- Complexos de Socransky adaptado ³⁴

Os indivíduos sofrem diferentes respostas imuno-inflamatórias frente aos microorganismos. Esta susceptibilidade para a evolução da doença periodontal ainda não está totalmente estabelecida, porém, sabe-se que a periodontite está associada a factores de risco, tais como: a predisposição genética, a idade avançada, o tabagismo, o etilismo, a gestação, as doenças sistémicas (p.ex. diabetes mellitus, neoplasias e infecções crónicas, nomeadamente infecções recorrentes causadas por vírus da espécie herpes), e o uso de alguns fármacos, tais como os anti-epiléticos, a ciclosporina e a nifedipina ³⁷.

A destruição do periodonto pode ocorrer por acção directa dos produtos bacterianos periodontais como a hialuronidase e a colagenase ou ainda por acção indirecta, onde a degradação é mediada pelo sistema imuno-inflamatório do hospedeiro. A resposta inflamatória consiste na primeira linha de defesa do organismo contra um agente agressor, podendo ser inata ou adaptativa. Tanto na resposta inata como na adaptativa há participação de elementos celulares e humorais. Na defesa celular há

participação dos neutrófilos, mastócitos, linfócitos T e B e plasmócitos e na defesa humoral participam o complemento, as citocinas interleucina 1(IL1), interleucina 4 (IL-4), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8) e o factor de necrose tumoral- α (TNF α) bem como as imunoglobulinas³⁸.

Tudo o que tem sido publicado sobre a etiologia microbiana da periodontite, e que geralmente é aceite, não é só da responsabilidade de um micro organismo, mas sim de um *consortium* de bactérias.

Para as bactérias periodontopáticas causarem doença, será essencial que sejam capazes de colonizar as bolsas periodontais e produzir factores de virulência que directamente danificarão os tecidos do hospedeiro. O correcto entendimento da etiologia patogénica, da placa supragengival e infragengival, está resumido no esquema adaptado a seguir. Quando a higiene supra gengival não é mantida, a placa bacteriana imediatamente aparece, por uma dinâmica de interrelação que atinge o clímax com o estabelecimento de uma microflora³⁸.

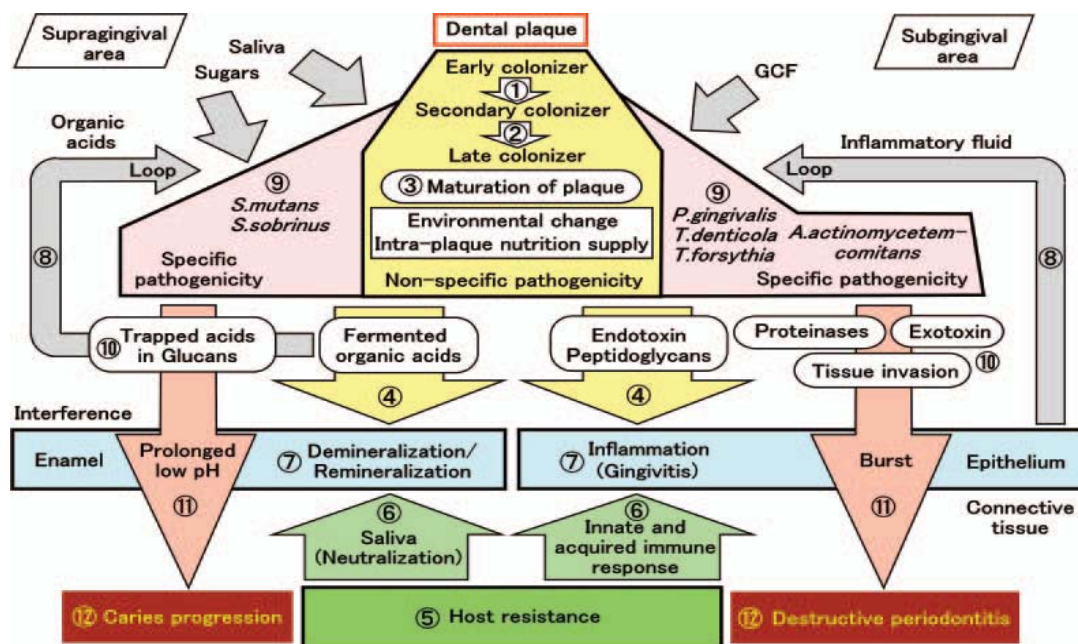


Figura 3-Nishihara & Koseki, in periodontology 2000 ecologia microbial da placa subgingival³⁸

1 - Vírus mediadores da destruição das defesas do hospedeiro

Vários Herpes vírus, incluindo Herpes simplex (hsv), Citomegalovirus (cmv), Epstein-barr vírus tipo-1 (ebv-1), foram, recentemente detectados nas amostras de fluido crevicular, em alguns tipos de periodontite agressiva³⁹⁻⁴¹.

Os vírus do tipo Herpes são capazes de infectar vários tipos de células incluindo polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos e linfócitos. As células inflamatórias infectadas pelo vírus tipo Herpes, podem reduzir as defesas do hospedeiro e os seus mecanismos, dando a possibilidade às bactérias periodontopáticas para crescerem na área subgingival e invadir tecidos e células mais eficientemente.

Um indivíduo pode simultaneamente apresentar uma infecção latente em algumas células e infecção activa noutras células. O vírus Herpes expressa proteínas líticas na fase de latência assim como na fase activa,

podendo interferir na actividade do sistema imune intacto e adaptativo e alterar o envolvimento celular³⁹⁻⁴³.

A alteração da resposta do hospedeiro assegura persistência das viroses no indivíduo infectado, contribuído para desenvolvimento da doença. As infecções activas por herpes vírus podem manter-se assintomáticas^{39, 40, 42, 43}.

2 - Patogenicidade das bactérias periodontopáticas

Muitos estudos da resposta inflamatória inata do hospedeiro aos componentes celulares das bactérias periodontopáticas têm sido efectuados com lipopolissacarídeos do *Aa.* e *Pg.* visto que estes são a maior superfície de antígenos das bactérias gram negativas.^{44, 45} Estes polissacarídeos são potentes indutores das citocinas nas células epiteliais, nos neutrófilos, nos monócitos e nos tecidos periodontais.

Tem sido descrito que o *Aa* produz múltiplos factores de virulência tais como: toxinas destruidoras tecidulares, leucotoxina, epitéliotoxina, toxina de reabsorção óssea, toxina de distensão citológica e a toxina de apoptose⁴⁶.

Uma das outras características na patogénese desta infecção é o poder de invasão das células do hospedeiro depois do microorganismo aderir a certos tecidos do indivíduo, quer directamente, quer através de outros microrganismos. Componentes extracelulares periodontopáticos, como fímbrias e outros agentes de superfície, são um potente mediador de aderência a células do epitélio oral. Será muito importante determinar se as bactérias periodontopáticas podem invadir as células do hospedeiro e contribuir para a iniciação e progressão da periodontite.³⁸

Estudos recentes de microscopia de imunofluorescência revelaram a presença de *Aa.* e *Pg.* em amostra tecidular de tecido gengival,

demonstrando a invasão do epitélio e endotélio. Os componentes extracelulares das bactérias, como fímbrias, actuam na adesão e estimulam a transdução de sinal.

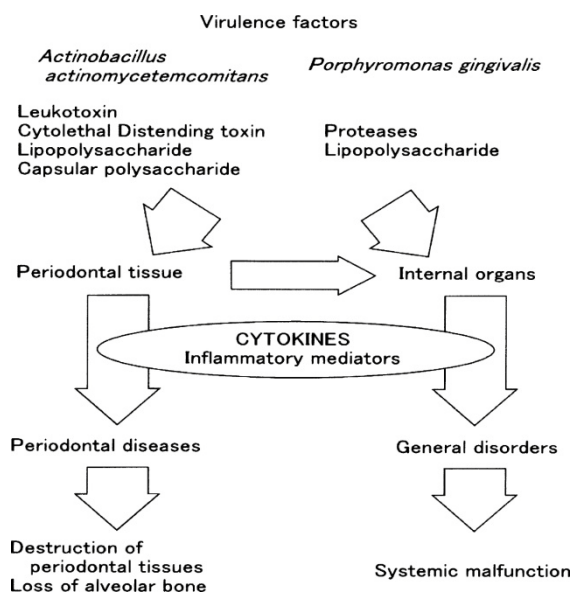


Figura 4-Nishihara & Koseki, in periodontology 2000, relação entre desordens orgânicas e bactérias periodontopaticos ³⁸

Presentemente, há interesse crescente no uso de antimicrobianos, que inclui os antibióticos, no controlo da periodontite resistente ao tratamento mecânico. O uso indiscriminado de antibióticos sistémicos, ou tópicos deve merecer cuidados especiais. As bactérias responsáveis pela persistência da infecção periodontal devem ser determinadas, assim como o seu antibiograma. Caso contrário, corre-se o risco de se produzir resistência em bactérias, às vezes responsáveis por infecções graves, devendo seleccionar-se então o grupo de antibióticos considerados mais eficazes para tratamento da doença periodontal⁴⁷.

3 - Antibióticos

3.1- Amoxicilina

A amoxicilina é um composto bactericida derivado da penicilina, que actua basicamente a nível de parede celular de maneira a impedir sua síntese. Este fármaco apresenta baixa toxicidade e ampla utilização em toda a área médica.

As maiores contra-indicações para seu uso são as reacções de hipersensibilidade à droga, ocorrendo aproximadamente em 15% dos adultos⁴⁷. A grande maioria dos microrganismos da placa bacteriana subgingival é sensível à acção desta droga, quando se administra 1 mg/ml a pacientes com doença periodontal. Administrando a amoxicilina (penicilina semi-sintética) a pacientes com periodontite juvenil localizada, verificou-se a eliminação completa de espiroquetas, por longo período, com melhoria nos padrões clínicos^{24, 48}. No entanto, Slots et al., demonstraram que aproximadamente 50% das cepas de *Aa*, entre outras, obtidas de pacientes afectados com periodontite, eram resistentes ao fármaco. Sabendo-se que este é o microrganismo com maior frequência na microbiota subgingival destes pacientes, o uso da penicilina torna-se duvidoso⁴⁹.

3.2-Tetraciclina

A tetraciclina é um antibiótico que apresenta amplo espectro de acção sobre as bactérias Gram⁻ e Gram⁺. Esta é considerada uma droga bacteriostática, actua inibindo a síntese proteica. Actualmente, é o antibiótico mais empregue como coadjuvante no tratamento periodontal. Estudos relatam a presença de altas concentrações no fluido gengival, osso

alveolar e tecidos inflamados. De acordo com Golub,⁵⁰⁻⁵² a tetraciclina pode inibir a colagenase (enzima bacteriana responsável pela destruição do colagénio).

Vários autores têm demonstrado o efeito benéfico deste fármaco, quando associado à raspagem radicular, especialmente para os casos de periodontite juvenil, periodontite refractária e periodontite de rápida progressão.

Segundo Hammond & Genco,^{53, 54} uma das muitas razões para a prescrição da tetraciclina na doença periodontal, é a concentração da droga no fluido gengival quando a dosagem é de um grama diário. Slots al,^{53, 54} não observaram diferenças significativas ao comparar um grupo de pacientes tratados com tetraciclina, associada à raspagem e alisamento radicular, com um grupo tratado sem antibiótico.

Em relação à resistência microbiana foram encontradas cepas de *Streptococos* resistentes à tetraciclina em 24 dos 25 pacientes com bolsas periodontais. Ainda, Roberts & Moncla⁵⁵ identificaram cepas de *Pi* resistentes à tetraciclina, em bolsas periodontais de pacientes que não receberam nenhum tipo de antibiótico nos seis meses que procederam o estudo.

Para Listgarten et al.,⁵⁶ a terapia com tetraciclina só tem valor quando a raspagem e o alisamento da raiz não puderem ser meticulosamente realizados.

Esta droga não deverá ser usada durante o período de desenvolvimento das dentições (metade final da gravidez e primeira infância até os 8 anos de idade), sob o risco de ocorrerem alterações permanentes de coloração dos dentes até mesmo hipoplasias do esmalte.

3.3 - Metronidazol

Este antibiótico é classificado como um quimioterápico devido a sua estrutura farmacológica. Enquanto os antibióticos são derivados de seres vivos, os quimioterápicos são totalmente produzidos de forma sintética. São drogas consideradas bactericidas e actuam a nível do ácido nucléico. O metronidazol apresenta largo espectro de acção, principalmente sobre as bactérias anaeróbicas. A característica marcante do fármaco é a sua alta concentração no fluido gengival.^{57, 58} Loesche & Colab^{59, 60} verificaram através de estudo duplamente cego que a administração de metronidazol, por uma semana, associado à terapêutica periodontal básica, reduziu as necessidades de complementação cirúrgica. Noutro estudo, Polson⁶¹ relatou que a indução de periodontite experimental em macacos não foi possível após a administração de metronidazol. Os autores observaram ainda que houve um aumento significativo no número de *estreptococos*. Os pacientes com periodontite de aparecimento precoce, incluindo a periodontite juvenil localizada, ou pacientes predispostos a periodontite por outras patologias, deverão ser tratados com antibióticos. Entre estes há que destacar todos aqueles pacientes que sofram de gengivite ulcero-necrosante.

3.4 - Ciprofloxacina

A ciprofloxacina é uma fluoroquinolona pertencente ao grupo das quinolonas. Essa denominação está relacionada com a adição de uma molécula de flúor na posição 6, e do anel piperazínico na posição 7, que melhorou a farmacodinâmica e farmacocinética, além de ampliar o espectro de acção contra os microrganismos Gram⁻, particularmente a *P. aeruginosa*^{62,63}.

Apesar de não constituir o antimicrobiano de primeira escolha, há alguns autores que recomendaram o uso da ciprofloxacina em Medicina Dentária, por demonstrar acção sobre os anaeróbios da cavidade bucal, apresentar eficácia para os aeróbios Gram⁺ (*Staphylococcus aureus* (*Sa*), *S. Staphylococcus epidermidis* (*Se*), *Streptococcus spp.*) e Gram⁻ entéricos (*Escherichia coli* (*Ec*), *Enterobacter spp* e *Pseudomonas*), com CIM 90 que varia de 0,015 e 2 µg/ mL.

Este antimicrobiano actua no citoplasma bacteriano, inibindo selectivamente a topoisomerase II do ADN-girase. Esta enzima tem a função de manter o ADN enovelado em espirais, permitindo situar-se fisicamente no interior do núcleo celular, morfologia que deve ser conservada durante o processo de divisão celular. Com a inibição desta, o ADN ocupa um espaço maior, provocando um aumento de volume e consequentemente, ruptura da parede da bactéria

A actividade moderada da ciprofloxacina sobre Gram⁺ é um senão no espectro da ciprofloxacina e das demais quinolonas de 2ª geração. Todos os estreptococos, independente da espécie, são sensíveis na concentração de 1,0 a 8,0 µg/ mL. Os microrganismos *Sa.* e *Se.* são susceptíveis em concentrações de 0,25 a 1,0 µg/ mL.

A concentração sérica máxima alcançada, após a administração de um comprimido de 500 g é de 2,4 µg/ mL e apresenta uma semi-vida entre 3 e 5 horas.^{62, 63}

Combinações da ciprofloxacina com outros antimicrobianos têm sido pesquisadas, com o objectivo de aumentar a eficácia contra bactérias isoladas da infecção endodontica. Em 1993, Sato et al.⁶⁴ constataram que a mistura de ciprofloxacina e metronidazol associada aos antimicrobianos amoxicilina, cefaclor, cefroxidina, fosfomicina, roxitromicina e minociclina, nas concentrações 100 µg/ mL de cada princípio, foi capaz de impedir o crescimento microbiano de todas as bactérias testadas. Nas concentrações inferiores, de 1 e 10 µg/ mL, o crescimento variou de acordo com o antimicrobiano empregue. Os resultados indicam que as lesões endodonticas podem ser controladas pela aplicação da mistura de antimicrobianos usadas topicamente.

Em 1996, Hoshino et al.,⁶⁵ demonstraram que a ciprofloxacina utilizada, isoladamente, não é capaz de eliminar os microrganismos da dentina infectada. No entanto, ao ser associada ao metronidazol, minociclina e ou cefaclor, os autores observaram ausência de culturas positivas. A ciprofloxacina apresenta rápida actividade frente aos microrganismos, não somente em fase de multiplicação, como também em todo o desenvolvimento.

Microrganismo	CIM (µg/ mL)
<i>S. piogenes</i>	0,5 a 1,0
<i>S. pneumoniae</i>	0,5 a 4,0
<i>E. faecali</i>	2,0 a 4,0
<i>S. aureus</i>	0,5 a 1,0
<i>S. epidermidis</i>	1,0 a 2,0
<i>Listeria</i>	8,0

Concentração Mínima Inibitória adaptado^{62, 63}

4 - Qual o antibiótico adequado?

Os sinais ou sintomas clínicos não indicam a selecção de antibiótico a usar. A selecção de antibiótico depende dos tipos bacterianos relacionados com a patologia periodontal. Os dentistas que seguem a hipótese de placa dentária não específica, indicam os antibióticos de largo espectro para eliminar o maior número de bactérias possível. Para os que seguem a hipótese da placa dentária específica, a eleição do antibiótico está de acordo com as recomendações indicadas para as bactérias específicas.

Tem sido demonstrado que uma placa dentária não específica, inclui mais de 400 diferentes espécies bacterianas,⁶⁶ muitas das quais se encontram proporcionalmente distribuídas de forma diferente, nas estruturas dentárias.

Muitas espécies bacterianas encontram-se em baixas concentrações, na microbiota subgingival. A complexidade da microbiota subgingival e todo o desconhecimento das relações ecológicas entre os microorganismos, favorece a hipótese da placa dentária não específica, sendo assim, a placa é removida periodicamente com destarização e alisamento radicular.

Quando a instrumentação periodontal não resolve o problema, como ocorre em todas as periodontites refractárias, a opção recomendada é metronidazol, ou a combinação de vários antibióticos como amoxicilina e metronidazol, ou doxiciclina e metronidazol.^{67, 68} Se esta fosse uma forma de actuar, os microorganismos eram suprimidos contínuo ou periodicamente e isto levava ao uso indiscriminado de antibióticos com o aumento da resistência bacteriana.

Para tratar a periodontite refractária usou-se os fármacos já mencionados, como a ampicilina, a amoxicilina e o ácido clavulânico, a

eritromicina, a doxiciclina e a cefalexina.^{69, 70} Outros autores usaram a penicilina, a tetraciclina, a minociclina e o metronidazol.⁷¹ Estes estudos indicam que muitos clínicos desconhecem como tratar as infecções periodontais. Como corolário poderemos afirmar que não existem antibióticos para eliminar ou suprimir as mais de 400 espécies bacterianas da placa dentária e esta seria a principal limitação da hipótese da placa não específica.

Na placa dentária específica, mais de uma centena de estudos realizados ao longo de 30 anos comprovaram e estabeleceram as diferenças entre a placa bacteriana relacionada com a saúde e a doença periodontal. A primeira associação entre uma doença periodontal específica e o microorganismo *Aa*, foi a periodontite juvenil localizada, agora denominada pela classificação de Armitage, periodontite agressiva localizada³

Antes de 1976, a periodontite juvenil localizada foi considerada como uma entidade degenerativa, periodontose que era tratada frequentemente com a extracção dos dentes afectados. Desde o reconhecimento da importância do *Aa* nesta patologia, todos os esforços foram centrados na supressão e eliminação deste microorganismo.^{72, 73}

A nova forma de ver esta patologia modificou muito favoravelmente o prognóstico para os dentes afectados. Na periodontologia moderna aceita-se que periodontite juvenil é uma infecção tratável.⁷⁴⁻⁷⁶

A descoberta da associação entre esta doença e um microorganismo impulsionou os investigadores a procurar uma eventual associação com outro tipo de doenças periodontais. Para cultivar e isolar o *Aa* usa-se o meio selectivo de vancomicina e bacitracina,⁷⁷ uma vez que este microorganismo está presente em pequenas quantidades no sulco periodontal. Esta bactéria está associada com as periodontites refractárias e periodontite de aparecimento precoce.^{12, 78}

Podemos também referir que outros microorganismos anaeróbios podem também acompanhar o *Aa* na patogênese periodontal.⁷⁹

5 - Qual é a atmosfera ideal dos microorganismos periodontais?

Esta pergunta pode ser respondida por todos aqueles estudos microbiológicos que determinaram a prevalência dos diversos microorganismos na placa dentária. Loesche⁵⁹ estudou a microbiologia subgingival em 120 pacientes que incluíam pacientes com periodontite juvenil localizada, periodontite de aparecimento precoce, periodontite do adulto e pacientes tratados com êxito da sua doença periodontal. Neste estudo, só as espiroquetas estiveram elevadas em pacientes com periodontite comparados com pacientes tratados. A *Pg* esteve elevada em pacientes com periodontite de origem precoce. Espécies facultativas como *Streptococcus sanguis* (*Ss*) e *Actinomices viscosus* (*Av*) resultaram aumentadas em pacientes periodontalmente tratados, surpreendentemente o *Aa* não foi detectado na periodontite juvenil localizada. O mesmo autor posteriormente estudou, 200 amostras de placa dentária em pacientes programados para cirurgia periodontal usando sondas de ADN, cultivando e determinando os anticorpos contra estes microorganismos periodontopáticos.⁸⁰ Este estudo encontrou o *Aa* 20 a 50 % nas placas dentárias estudadas, no entanto, a *Pg*, a *Tf* e o *Td* apareceram entre 80 a 100% das placas estudadas. Todos estes achados parecem indicar que os microorganismos anaeróbios são mais prevalentes que os microorganismos micro-aerofílicos.⁸⁰

Outros investigadores vão no sentido de obterem os mesmos resultados, como Moore.⁶⁶ No entanto, Socransky⁷⁹ chegou à conclusão que há associação entre *Pg Tf e Td*, profundidade da bolsa e sangramento à

sondagem, num estudo que usou sondas de ADN. Este investigador estudou três mil amostras de placa dentária.

Ashimoto,⁸¹ também encontrou espécies de anaeróbios com mais prevalência que o *Aa*, na placa dentária de pessoas com periodontite do que em de crianças com gengivite. Este estudo determinou a prevalência de 8 periodontopáticos por reacção da cadeia da polimerase.

Muitos estudos referiram que os microorganismos anaeróbios como a *Pg*, a *Tf* e o *Td* são mais prevalentes que o *Aa*^{66 73}. Outros microorganismos como o, *Fn* e a *Parvimonas micros*, são microorganismos prevalentes em amostras de placas com colheitas de locais de actividade periodontal.^{82, 83}

6 - Importância do diagnóstico microbiológico e do antibiótico a seleccionar.

A cultura microbiológica com condições de anaerobiose e micro aerofília permite estabelecer a microbiota subgengival. Com a cultura determinam-se as proporções relativas do microorganismos periodontopáticos, a presença de micro organismos oportunistas e a sensibilidade antibiótica. As desvantagens das culturas microbianas são: o alto custo, a necessidade de pessoal altamente especializado e treinado, a impossibilidade de cultivar e identificar todos os microorganismos sub gengivais e o limitado tempo de sobrevivência da amostra no meio de transporte.⁸⁴

As técnicas moleculares para detectar as bactérias periodontais incluem sondas de ADN e a reacção da cadeia de polimerase. Estas técnicas não requerem organismos vivos e tem elevada sensibilidade e

especificidade. Com o uso de técnicas moleculares também se podem identificar cepas virulentas ou determinar a sensibilidade antibiótica pela detecção de plasmídeos e genes de resistência bacteriana⁸⁵.

As técnicas genéticas moleculares são mais rápidas e simples que as culturas mas, no entanto, têm um custo algo elevado. As principais desvantagens das técnicas moleculares são:

- Dificuldade em determinar o número de bactérias periodontopáticas numa amostra.
- Estabelecer as proporções dos microorganismos.
- Excessiva sensibilidade da prova.

Os anticorpos monoclonais e policlonais também foram usados para detectar bactérias periodontopáticas em amostras subgingivais. A maioria destas técnicas de diagnóstico baseia-se no IFA ou ELISA. A sua grande limitação é a dificuldade para determinar uma gama ampla de bactérias e impossibilidade de determinar a sensibilidade antibiótica.

Também podem ser usados microscópios de contraste de fase para identificar os diversos morfotipos bacterianos: cocos, bacilos móveis ou imóveis, espiroquetas e as células inflamatórias do fluido crevicular. O microscópio de campo escuro foi usado para determinar o número de espiroquetas nas amostras de placa dentária.⁸⁶

Esta forma de chegar a um diagnóstico é discutível, pois muitos indivíduos periodontalmente saudáveis têm espiroquetas ou bacilos móveis na placa dentária, e talvez o sulco seja uma via natural de excreção de células inflamatórias, como os polimorfonucleares neutrófilos.

Técnicas microbiológicas como o BANA (N-benzoil-DL-arginina-2-naphthylamide) são utilizados para determinar a habilidade de certas bactérias subgingivais para hidrolisar um substrato susceptível da tripsina.⁸⁷

As três importantes bactérias como a *Pg*, *Tf*, e *Td* são positiva para o BANA podendo ser determinado em 10 a 15 minutos no consultório, contudo o valor achado por este método é controverso para escolher um antibiótico.

6.1- Como deveremos seleccionar um antibiótico?

A doxiciclina, a clindamicina, a amoxicilina e o metronidazol são antibióticos activos contra a maioria dos anaeróbios. As quinolonas são também activas contra os anaeróbios, embora tenham aumentado os níveis de resistência.⁸⁸ Dos antibióticos mencionados, o metronidazol deverá ser a de primeira opção pela sua especificidade contra anaeróbios, e também, porque parece afectar muito pouco a microbiota periodontal associada à saúde periodontal.^{73, 89}

O metronidazol foi amplamente estudado no tratamento da periodontite, havendo cerca de 12 estudos duplamente cegos revelando a sua efectividade.⁹⁰

A doxiciclina tem um espectro mais amplo que o metronidazol, sendo efectiva contra alguns microorganismos micro aerófilos. Dois estudos confirmaram-no,^{91, 92} ao demonstrar que este antibiótico é efectivo para tratar a periodontite no adulto e também a periodontite juvenil localizada.⁷⁴ A tetraciclina não deveria ser usada na actualidade, porque 12% da placa subgingival é resistente a este fármaco e porque as espécies que contêm o gene da resistência T e Q são anaeróbias gram⁻, incluindo *Bacterioides* e *Prevotella*.⁹³

7- Microbiota periodontal

A microbiota periodontal é constituída por bactérias presentes na placa sub gengival, sobretudo as relacionadas com a iniciação e progressão da doença periodontal, em particular “red complex” espécies *Tf*, *Pg*, *Td*;⁹⁴,⁹⁵ muitas espécies são comensais na cavidade oral como a *Pg* e o *Aa*, apresentadas graficamente na figura 2.

Os factores de virulência particularmente significativos no “red complex”, não serão particularmente importantes na sua identificação, mas sim na forma como eles descriminam a sua real virulência.¹³

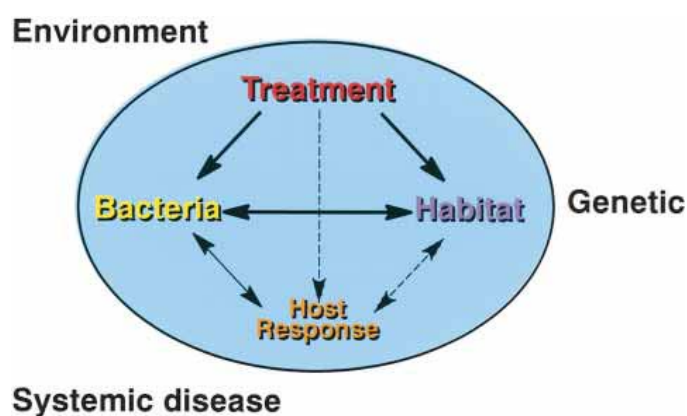


Figura 5 – Representação do efeito genético e ambiental na interrelação bactéria – hospedeiro - habitat e tratamento. (Socransky & Haffajee)²

Há uma grande relação entre a doença periodontal e a composição da placa subgengival, mais apropriadamente designada como biofilme subgengival. A microbiota subgengival em indivíduos não difere notoriamente da dos indivíduos com periodontite.^{13, 34}

O envolvimento de microrganismos na etiologia da doença periodontal está bem estabelecido, entretanto, uma completa identificação

de todos os agentes microbianos envolvidos com a doença periodontal, ainda não está totalmente definida. Tem sido estimado que aproximadamente 500 espécies diferentes de bactérias habitam a cavidade oral.⁹⁶

A compreensão da potencialidade patogénica dos microrganismos envolvidos na doença periodontal viu-se altamente reforçada com este novo e importante conceito de biofilme e o seu significado. Assim, o simples termo de placa bacteriana encontrou um suporte mais consistente no entendimento e mecanismo de acção dos agentes infecciosos na periodontite.³⁴

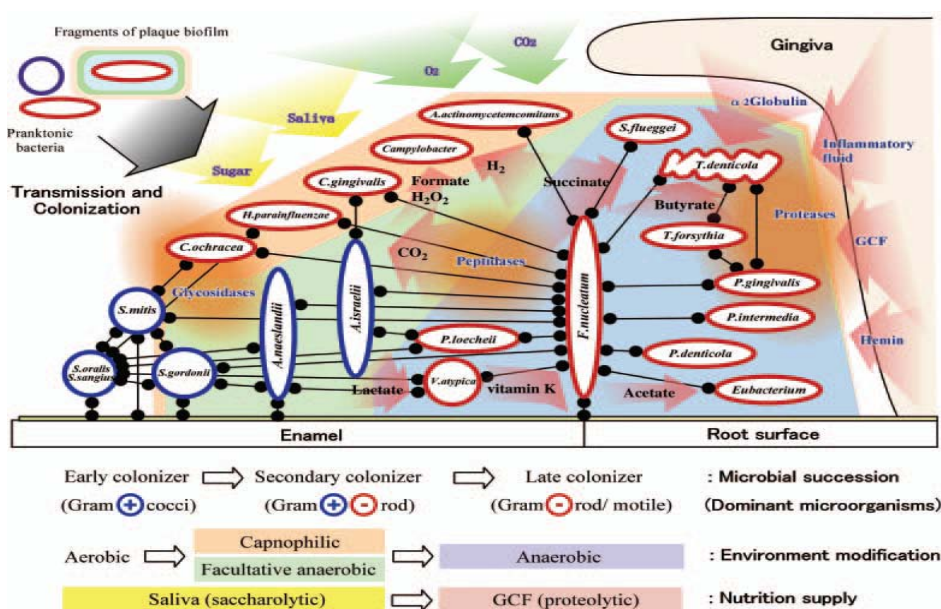


Figura 6- Nishihara & Koseki, in periodontology 2000 ecologia microbial da placa subgingival

8 - Resistência bacteriana

A resistência bacteriana a agentes antimicrobianos pode ser definida quer genotipicamente, onde é conferida à bactéria a transmissão de elementos de resistência, quer fenotipicamente, onde as bactérias podem sobreviver e crescer acima de uma determinada quantidade de substâncias antibacterianas *in vitro*, ou quer ainda clinicamente, onde em seres humanos, as bactérias são capazes de se multiplicar na presença de determinadas concentrações de fármacos durante a terapêutica (Andersson, 2004)^{97, 98}.

8.1 - Resistência natural

Todos os microorganismos de uma determinada espécie bacteriana não são sensíveis aos antibióticos escolhidos. As bactérias não possuem estruturas específicas que funcionam como moléculas alvo para o antimicrobiano ou pela falta do processo metabólico para activação do antimicrobiano. Bactérias como, o *Mycoplasma Spp*, são resistentes aos antibióticos β -lactâmicos por não possuírem parede celular.^{97, 98}

8.2 - Resistência adquirida

Contrastando com a resistência natural, este tipo de resistência é encontrado em apenas alguns genes? isolados de uma determinada espécie bacteriana. Este modelo de resistência foi determinado pela evolução devido a alterações genéticas, desenvolvidas através de dois mecanismos: mutações cromossômicas no genoma bacteriano preexistente, ou mais frequentemente, transferência horizontal de genes entre bactérias dentro e fora da mesma espécie. Na disseminação de genes de resistência ou na

transferência horizontal de genes, o gene de resistência tem que ser inserido dentro de um elemento genético transferível, plasmídeo, transposição ou integrão. A introdução destes elementos numa bactéria pode ocorrer através de três mecanismos: transformação, transdução e conjugação.

8.3 - Mecanismos de resistência

Os mecanismos de defesa, codificados pelos genes de resistência adquirida, são utilizados pelas bactérias para a sobrevivência num ambiente hostil perante a presença de antimicrobianos para erradicá-las^{97, 98}:

- a) Alteração estrutural da molécula-alvo de forma a impedir a ligação do antibiótico, mais prevalente em cocos Gram positivos.
- b) Exclusão do antibiótico da entrada na célula. Vários antimicrobianos utilizam os canais de purina quando o objectivo dos antibióticos é invadir bactérias Gram⁻. Assim a diminuição da expressão das purinas resulta na impermeabilidade ou na diminuição da-captação.
- c) Os antibióticos são bombeados para fora da célula através de um mecanismo de bombas de fluxo. As bombas podem activar o transporte do agente.
- d) Inactivação através da degradação enzimática, sendo o exemplo mais comum, a resistência contra os β -lactamicos.

Antibiotic	Mode of action of antibiotic	Bacterial response
Penicillins and cephalosporins	Inhibition of synthesis of the cell wall	<ul style="list-style-type: none"> • Destruction of the β-lactam ring by β-lactamases • Conformational modification of the target • Reduction in autolysis
Erythromycin	Inhibition of protein synthesis	<ul style="list-style-type: none"> • Immediate excretion by intramembranal pumps • Conformational modification of the antibiotic target
Tetracycline and derivatives	Inhibition of protein synthesis	<ul style="list-style-type: none"> • Immediate excretion by intramembranal pumps • Conformational modification of the antibiotic target • Enzymatic modification of the antibiotic
Metronidazole	Inhibition of DNA replication	<ul style="list-style-type: none"> • Lack of metronidazole activation through modification of bacterial nitroreductases • Reduction in uptake

Tab.I Mecanismos de resistência dos principais antibióticos usados em periodontologia, ⁹⁹

8.4 - O uso de antibióticos e o desenvolvimento de resistências

O contínuo desenvolvimento de resistências é um resultado biológico natural resultante da utilização contínua de antibióticos.¹⁰⁰ Este aspecto particular representa a evolução bacteriana que é geneticamente determinada apresentando vantagens em termos de sobrevivência. A pressão selectiva aplicada numa população bacteriana representa uma força para a resistência bacteriana. Assim, os clones de bactérias resistentes têm sido continuamente seleccionados como uma resposta evolutiva da utilização de antibióticos. Esta selecção é determinada pelo consumo total de antibióticos com particular atenção no que estes agentes são utilizados. A correlação entre o antibiótico usado e o aparecimento de resistências é consideravelmente mais elevado nos países com elevados consumos de antibióticos.¹⁰¹

Os factores de risco para o aparecimento de perfis de resistência são o acesso e a utilização abusiva de antibióticos, a existência de agentes de qualidade nefasta e o desrespeito por parte do paciente à prescrição médica. Além disso, a disseminação de bactérias resistentes é facilitada por medidas de controlo de infecção inadequada, deficiência nos serviços de saúde, em práticas de higiene, saneamento e saúde pública.¹⁰²

O potencial de reversibilidade deste factor é uma questão discutível, as hipóteses de sucesso diferem entre os painéis hospitalares e da comunidade. A fundamentação para a reversibilidade reside no facto de as bactérias resistentes terem uma maior desvantagem em relação a estirpes susceptíveis em ambientes isentos de antibióticos.¹⁰² Uma diminuição na quantidade de antibióticos usados deverá conduzir a baixa da pressão selectiva e a uma redução na proporção de bactérias resistentes a um determinado antibiótico. Desta forma, Feres et al.,¹⁰³ demonstraram que a prevalência de bactérias subgingivais resistentes à amoxicilina que surgiam por volta dos 14 dias da terapia, diminuía 37% para o valor inicial (0,5%), num total de 90 dias.¹⁰³ Acredita-se que a reversibilidade seja menor na comunidade do que num ambiente hospitalar, já que o uso contínuo de antibióticos nos hospitais permitiria uma maior adaptabilidade.

Está aceite que quanto maior for a percentagem de utilização de antimicrobianos, maior será a pressão aplicada na população bacteriana, e então será maior a emergência de bactérias resistentes. Consequentemente, é fundamental a existência de um circuito de informação detalhada acerca da utilização de antibióticos, sendo cada vez mais indispensável a medição do seu consumo, bem como o acompanhamento dos novos painéis de resistência. Neste contexto é evidente que após o diagnóstico clínico e microbiológico das periodontites, a execução de antibiograma permitindo ao clínico prescrever antibióticos segundo as directrizes do laboratório, evitando-se assim a medicação empírica tão generalizada.

III - Objectivos do estudo

1- Caracterização clínica dos pacientes com doença periodontal aplicando os parâmetros internacionalmente reconhecidos.

2- Demonstração da importância da aplicação da metodologia da colheita da amostra clínica para o estudo microbiológico.

3- Identificação das bactérias causadoras do processo infeccioso periodontal.

4. Estudo da susceptibilidade frente aos antibióticos das bactérias patogénicas periodontais aplicando o método da Concentração Mínima Inibitória.

IV - Material e Métodos

1 - Caracterização da amostra

A população estudada incluiu 15 pacientes, que participaram após pré-requisito de aceitação. A proveniência das amostras foi de uma Clínica Dentária com Serviço diferenciado de Periodontologia, localizado na cidade de Vila Nova de Gaia. Um dos casos diagnosticados com PCG foi excluído por não ter havido crescimento

Foram considerados critérios de exclusão: a terapêutica antibiótica nos 6 meses anteriores à consulta, assim como também, a avaliação dos terceiros molares.

Tabela II Descrição dos pacientes

Idade	Género	Diagnóstico clínico do tipo de Periodontite
38	F	PCG
24	F	PAG
44	M	PCG
48	M	PCG
65	F	PCG
35	F	PAL
62	F	PAG
31	M	PAG
39	M	PCG
56	M	PAG
55	F	PCG
37	F	PCG
43	M	PCG
45	F	PCG
47	F	PCG

Média etária: 44,6 (\pm 11, 37 d.p.)

2 - Avaliação clínica

Os exames clínicos foram realizados segundo o protocolo clínico do serviço de Periodontologia da clínica privada, que consistiu na sondagem de 6 sítios (mésio-vestibular, vestibular, disto vestibular, disto lingual, lingual e mésio lingual) sobre todos os dentes presentes, excepto os terceiros molares.

2.1- Anamnese

Consistiu no preenchimento de um questionário sobre antecedentes médicos e médico-dentários pessoais e familiares, motivo da consulta, hábitos de higiene, hábitos tabágicos e inquirição sobre a tomada de antibióticos nos últimos 6 meses resultando da resposta afirmativa a exclusão do estudo. Estes dados foram registados na ficha clínica da sonda Florida.

2.2 - Profundidade do sulco

A medição da profundidade do sulco gengival, isto é, a distância entre a margem gengival até o fundo do sulco, foi feita com uma sonda periodontal graduada em todas as faces do dente por toda a dentição.

Todos os pacientes foram submetidos a uma sondagem clínica com sonda Florida Probe, em 6 faces de cada dente. Todos os dados foram registados na ficha periodontal.

2.3 - Quantificação da perda de aderência

Foi registrada a perda de aderência pela profundidade da bolsa, quando não existe migração apical da gengiva visível. Se esta existe, denomina-se recessão gengival. O valor da perda de aderência foi registrada pela mediada da perda de aderência adicionada à medida da recessão gengival que é a distância que vai desde a junção esmalte cimento até à margem gengival. O exame foi feito em todas as faces de cada dente, onde era evidenciada a perda.

2.4 - Quantificação do índice de sangramento à sondagem

A sondagem ao sangramento também foi feita com sonda florida Probe, em seis locais. Esta sondagem permitiu a avaliação percentual dos sítios que sangram, ou não, a uma leve sondagem do sulco. Foram registrados os locais que apresentavam sangramento à sondagem e calculada a sua percentagem na totalidade e de locais por dente. Esta percentagem foi conseguida de uma forma computadorizada, segundo o recomendado por Ainamo e Ray¹⁰⁴.

2.5 - Quantificação de placa

A quantificação da placa realizou-se por revelação, com uma solução de fucsina básica a 2% colocada em todas superfícies dentárias, com um cotonete, que cora os locais que apresentam placa bacteriana. Estes dados foram registrados no software que acompanha a Sonda Florida.

2.6 - Perda de osso alveolar

Com o objectivo de complementar a formulação do diagnóstico, os 15 pacientes foram submetidos a exame radiológico, que consistiu numa série de radiografias peri-apicais com o uso de angulador de Rinn, possibilitando a qualificação de perda de osso alveolar em: simples quando se visualizou a lâmina dura ou quando a reabsorção era no sentido horizontal ou em complexa, quando a perda era no sentido vertical.

2.7 - Quantificação da mobilidade dentária

A mobilidade dentária foi classificada por métodos simples utilizando a técnica de forçar com a ponta dos dedos indicador e do polegar, fazendo um esforço de movimentando em todos os sentidos. A mobilidade foi classificada segundo a facilidade de movimento na escala seguinte; grau 0 - mobilidade fisiológica; grau 1- mobilidade perceptível não visível; grau 2 - mobilidade <1mm perceptível e visível; grau 3- mobilidade > 1mm; grau 4- mobilidade axial.

2.8 - Recessão gengival

A recessão gengival é a migração da margem da gengiva na direcção apical e traduz a perda de nível de inserção visível. Esta medida foi realizada com a sonda Florida Probe, desde a junção esmalte cimento até a margem gengival; isto em todas as seis faces do dente que apresentavam migração da gengiva visível.

2.9 Diagnóstico Clínico

Na Tabela II está indicada a descrição dos pacientes, quanto ao sexo e idade, efectuada após avaliação clínica.

3 - Colheitas

3.1- Sítio da Colheita

Um total de 15 colheitas foram efectuadas nos locais, (descritos no item 2), mais significativos de manifestação da doença periodontal activa.

3.2 - Técnicas de colheita das amostras

Antes de se efectuarem as colheitas da amostra subgingival, procedeu-se à eliminação da placa supragengival, com a ajuda de uma compressa estéril e com um isolamento relativo com rolos de algodão nos sítios da colheita.

As colheitas foram efectuadas em dentes com profundidade de bolsa maior ou igual a 4 mm. Foi usada uma ponta de papel estéril (Mynol - Absorbent paper points - Fine), por sítio, dentro da bolsa gengival, introduzindo até a sensação de resistência e deixando no sulco cerca de 20 segundos. A seguir as pontas de papel foram rapidamente colocadas dentro do meio de transporte VMGAI (Moller, 1966).



Fig. 7. Meio de transporte

3.3 - Transporte de amostras

Todas as amostras foram transportadas ao laboratório, o mais rapidamente possível, e introduzidas na estufa de 37°C durante 10 minutos, com o fim de amolecer a gelatina do meio.

3.4 - Meio transporte

O meio de transporte utilizado neste estudo foi o recomendado por Slots 1986³⁰, que assegura a preservação dos microrganismos periodontais, VMGAIII de Möller, 1966¹⁰⁵. Este meio é complexo, apresentando-se a sua composição na Tabela III. O referido meio é normalmente preparado no laboratório de Microbiologia Oral, onde foi executado o trabalho.

Tabela III.- Composição do meio VMGA III (Möller, 1966)

Milieu base – composition en g/l		Solution de sels – composition en g/l	
A – Tryptose, Difco Laboratories 0124	0.5g	a) Acétate phénylmercurique (Merck)	0.05g
Thiotone, BBL Microbiology Systems 02-108	0.5g	Eau distillée	300ml
Eau distillée	540ml	b) Glycérophosphate de sodium (Merck)	100g
B - Agar washed 4%	50ml	Eau distillée	200ml
C – Gélatine Difco Laboratories	50g	c) CaCl ₂ 6H ₂ O	1.6g
Eau distillée	300ml	KCl	4.2g
D – Acide thioglycolique, Difco Laboratories 0250	0.5ml	NaCl	10g
E – Solution de sels	100ml	MgSO ₄ 7H ₂ O	1g
F – Solution de cystéine		Eau distillée	300ml
Cystéine –hydrochloride, Merck 2839	0.5g	d) Bleu de méthylène (Merck)	0.03g
Eau distillée	10ml		

4 - Observação microscópica directa da amostra.

4.1- Coloração de Gram

Serviu para avaliar o predomínio de bactérias Gram⁺ ou Gram⁻, a sua morfologia e agrupamento assim como também, outros elementos celulares, tais como, os leucócitos polimorfonucleares, as células epiteliais, os odontoblastos, etc.

4.2- Coloração de Vago

Esta coloração proposta em 1953¹⁰⁶, foi utilizada para evidenciar as espiroquetas a partir da amostra clínica. A coloração utiliza mercúrio-cromo e cristal violeta (a mesma do Gram). A técnica consiste em cobrir o esfregaço com a solução de mercúrio-cromo durante 3 a 5 minutos, seguido de lavagem com água e coberto de solução cristal violeta durante minutos

5 - Cultura

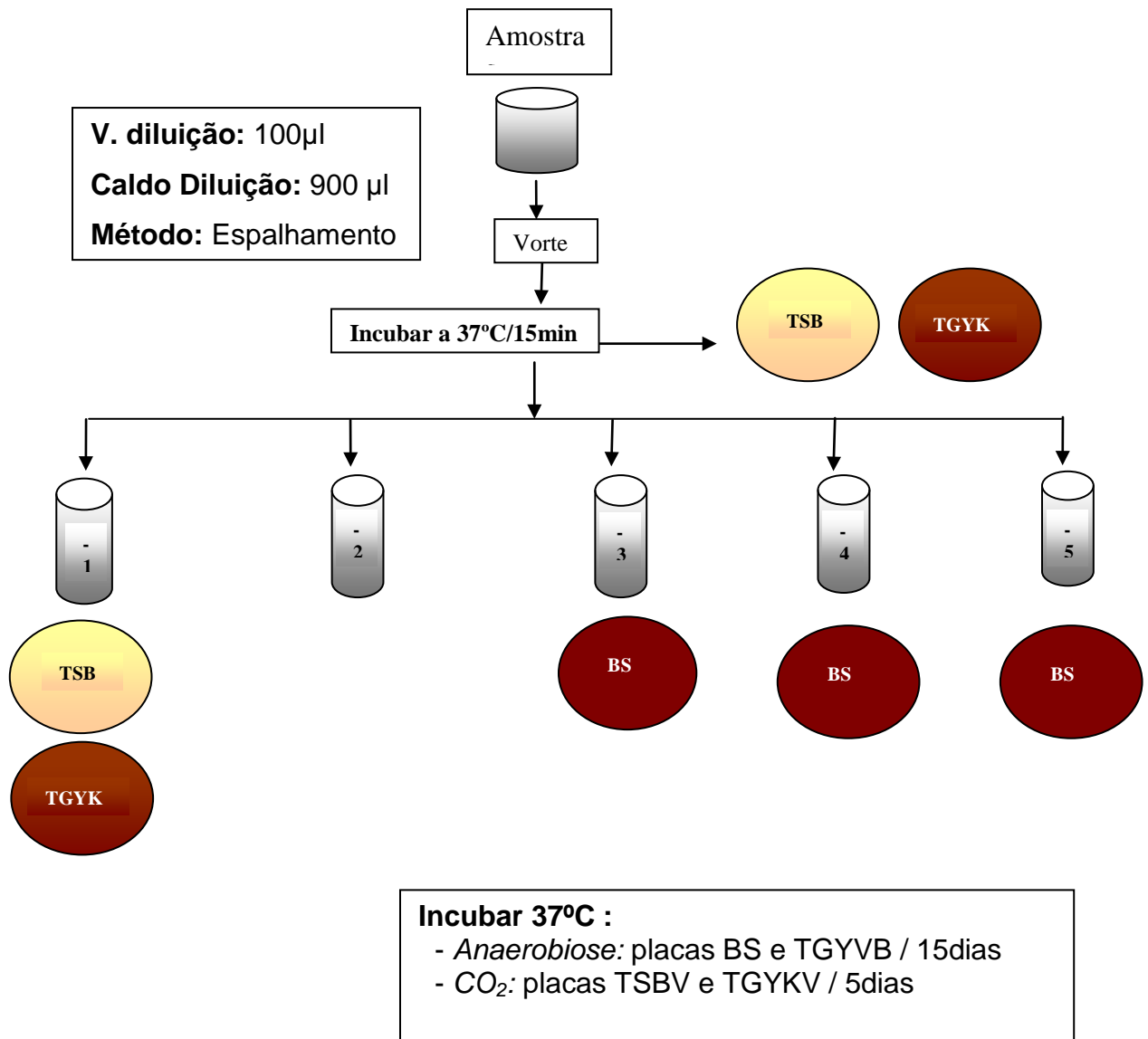
5.1- Dispersão da amostra

Antes de proceder ao cultivo, o meio de transporte contendo a amostra foi homogeneizado durante 45 segundos à velocidade máxima do Vortex (DG-Mix-27, Grifols S.A.).

5.2 - Diluição em série

A diluição da amostra foi efectuada, seguindo os procedimentos, assinalados na fig.8.

Fig. 8.- Diluição em série



5.3 - Meios de cultura

5.3.1- Meio não selectivo, enriquecido com Brucella Agar

O meio não selectivo Brucella Agar (BA) constituído por 45 gramas de Brucella Agar de base (Oxoid), 3 g de gelose (Oxoid), 2g de extracto de levedura (Difco Laboratoires) por litro de água destilada, suplementado com 5% de sangue desfibrinado de carneiro (BioMérieux), 0.2% sangue hemolizado de carneiro (BioMérieux), 0.0005% de hemina (Sigma) e 0.0005% menadione (Sigma), foi utilizado para contagem total de bactérias viáveis e para determinação da proporção de bactérias específicas em relação à flora total.

Para cada amostra foram utilizadas 3 placas de Agar Brucella (meio enriquecido das diluições, correspondentes a 10^{-3} , 10^{-4} e 10^{-5} , conforme se mostra na figura 1.

5.3.2- Meio selectivo TSBV

O meio selectivo de TSBV (Trypticase Soja-Serum Bacitracina-Vancomicina) é composto por Trypticase de soja agar (Oxoid)(30G/L) e 1g de extracto de levedura (BioMérieux) por litro de água destilada, adicionado de 100 ml de soro de cavalo, 75mg de Bacitracina (Sigma) e 5 mg de Vancomicina hidrocloreto (Sigma). Foi utilizado para o isolamento do *Aa*.

5.3.3 - Meio selectivo TGYKV

O meio de TGYKV é composto de 30g de Biotrypticase Agar (Oxoid), 20g de extracto de levedura (Difco, Laboratoires), 5g de glicose

(Difco, Laboratoires), 0.5g de L- cisteine hydrochloride monohydrate (Sigma) por litro de água destilada e 50ml de sangue de carneiro (BioMérieux), 100µg/ml de Kanamicina (Sigma) e 7.5µg/ml de Vancomicina (Sigma). Foi utilizado para o isolamento de *Capnocytophaga* spp.

5.3.4 - Sementeira

Foram inoculados 100µl de cada diluição na superfície dos meios respectivos e semeados com ansa de Drigalsky estéreis, sempre da maior diluição para a menor.

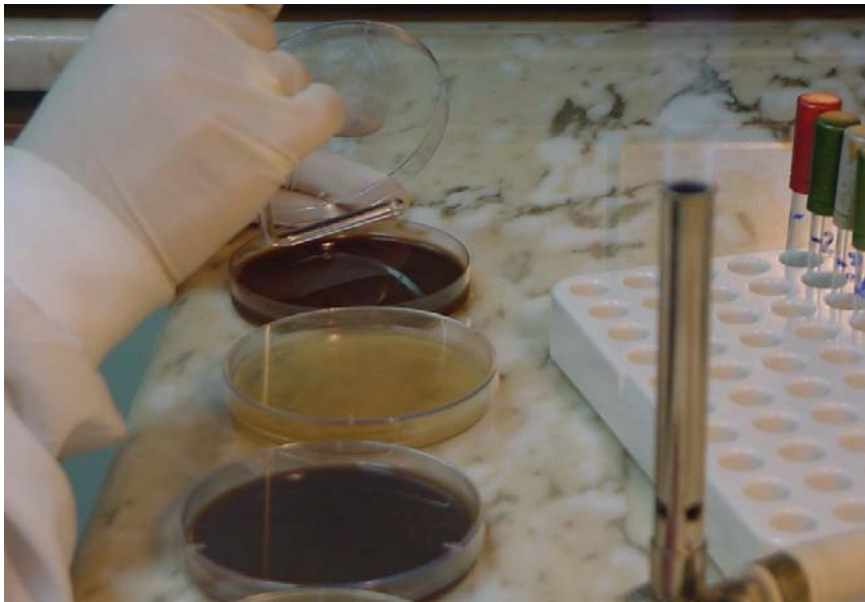


Fig. 9 Sementeira

5.3.5 - Incubação em atmosfera com 10% de CO₂

Após sementeira, as placas de TSBV e de TGYKV foram colocadas em jarra com uma atmosfera de 10% de CO₂, criada por um sistema gerador de CO₂ (Oxoid-Unipath). O sistema é constituído por um saco, colocado em posição vertical na jarra, a qual foi fechada hermeticamente e introduzida na estufa a 35-37°C para a incubação durante 3 a 5 dias.

5.3.6 - Incubação em anaerobiose

As placas de Agar Brucella foram colocadas em jarra com um sistema gerador de anaerobiose e um indicador que permite verificar que a anaerobiose é mantida ao longo do tempo de incubação. A jarra foi imediatamente fechada e introduzida na estufa a 35-37°C para a incubação durante 10 a 12 dias.



Fig. 10 Jarra Gaspak com ambiente anaeróbio para crescimento bacteriano

6 - Testes presuntivos utilizados para identificação das bactérias periodontopáticas

A identificação presuntiva foi de acordo ao preconizado por, Slots 1998³⁰,
107

6.1 - Catalase. Foi utilizado peróxido de hidrogénio 3% (A.a). O teste é positivo pelo aparecimento do borbulhar devido à conversão de H_2O_2 em H_2O e O_2 .

6.2 - Oxidase. Teste realizado em discos de papel impregnado de dimethyl-p-phenileno diamine (bio-Merieux). *Capnocytophaga* spp são oxidase negativo.

O teste consiste em colocar 1 a 2 colónias. A reacção é positiva pelo aparecimento da mudança da cor rosa para púrpura após 5 minutos. A reacção negativa é observada pela ausência de mudança de cor

6.3 - Fluorescência em UV. Utiliza-se uma lâmpada de UV de 355 nm de comprimento de onda num quarto escuro. Uma fluorescência vermelho-escarlata, indica que o teste é positivo para *Pi*

6.4 - CAAM. É um teste que evidencia produtos fluorescentes após hidrólise tríptica. A prova é positiva quando fluoresce após irradiação UV aparecendo uma cor branca cal. Negativa, quando apresenta fluorescência branco-azulado¹⁰⁸.

6.5 - MUG. É um teste que serve para evidenciar a hidrólise do substrato B-D-galactoside combinado com um composto químico que fluoresce quando se irradia com UV e resulta na formação de um outro composto brilhante fluorescente indicando positividade¹⁰⁹.

6.6 - Observações microscópicas. Mobilidade: A mobilidade foi observada a partir de uma suspensão da colónia bacteriana em água destilada estéril e visualizada em fresco, utilizando o microscópio de luz

com objectiva de contraste de fase com filtro verde a um aumento de 40x e objectiva de imersão 100x.

6.7 - Colorações Diferenciais. As colorações foram realizadas com prévia fixação do esfregaço com o calor de uma lamparina de álcool.

7 - Determinação da sensibilidade aos antibióticos das estirpes

A determinação da susceptibilidade aos antibióticos foi realizada em algumas das espécies identificadas e não feita em todos os isolados porque não foi possível manter as espécies devido a sua curta viabilidade. No entanto, pela menos uma ou duas espécies de cada caso foram testadas. O método utilizado foi da concentração mínima inibitória. A concentração mínima inibitória (MIC), define-se como a menor concentração do antibiótico que impede o crescimento visível da estirpe estudada. Utilizou-se o método de Epsilon teste, que é uma tira de filtro contendo diferentes concentrações de antibiótico numa escala da mais baixa à mais elevada concentração de antibiótico. O teste foi aplicado para 15 espécies bacterianas e usou-se como controlo as estirpes de referência do Instituto Pasteur. Os antibióticos utilizados nos testes de sensibilidade, MIC pelo E-test (AB BIODISK®) foram, a amoxicilina, a amoxicilina + ácido clavulânico, o metronidazol, a tetraciclina e a ciprofloxacina. Os inóculos das estirpes de ensaio foram preparadas em suspensões em NaCl 0,9% ajustada para uma turbidez equivalente a 10^8 da escala nefelométrica de McFarland 0,5 e inoculadas em ágar Brucella sangue colocou-se uma tira de cada antibiótico nas placas, foram incubadas em condições adequadas às bactérias capnofílicas e anaeróbias. As estirpes de Referência de *Aa*, *Pg*, *Pi* e *Capnocytophaga gingivalis* foram incluídos, como controlo da susceptibilidade (fig 11)

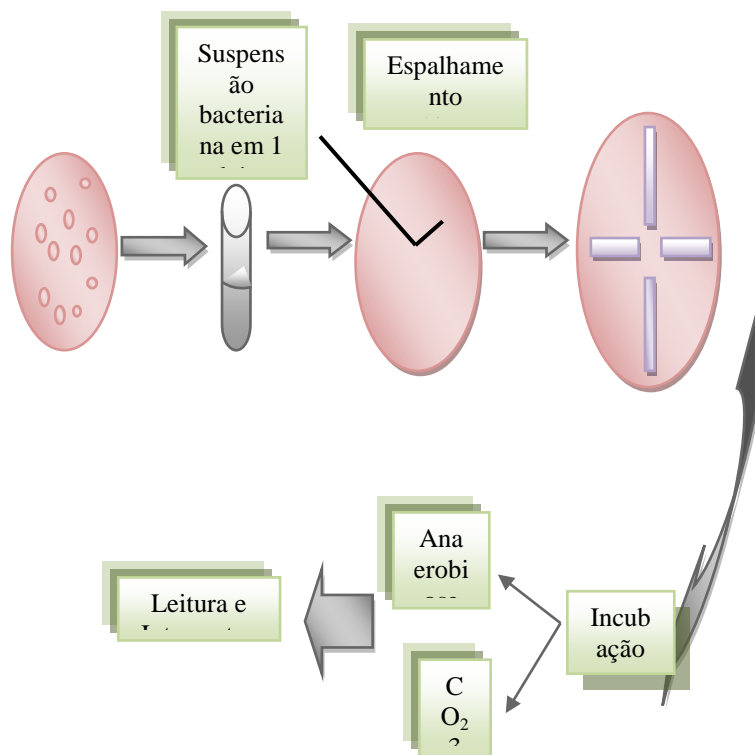


Fig. 11- Procedimentos relativos ao Teste de sensibilidade (E-test) frente aos antibióticos:

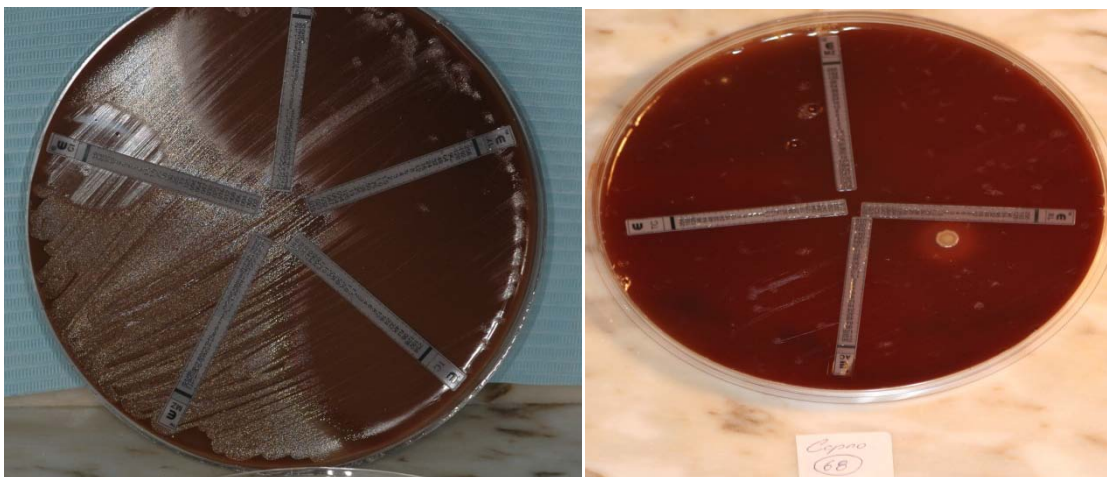


Fig.12 E-test de *Aa* frente a 5 antibioticos e *Capno* respectivamente

TabelaIV - Controlo do CMI, E-TEST, com cepas de referência

ANTIBIOTICO

NOME BACTERIA	AMOXICILINA	CIPROFLO	AMOXI/AC.	METRONIDAZ.	TETRACICLIN.
<i>Capno gingivalis</i> CIP 102945	S	0.23	S	R> 256	0.032
<i>Aa</i> CIP 52106	0.047/0.064	S	0.38/0.40	S	S
<i>Pi</i> CIP 103607	S	S	S	S	S
<i>Pg</i> CIP 103683	S		S	S	S

CIP, Culture Instituto Pasteur, Paris

V - RESULTADOS

1 - Idade, género e hábitos tabágicos

Na tabela V, podemos observar que os pacientes foram agrupados e diferenciados em grupos etários, género e hábitos tabágicos. As idades da maior parte dos pacientes estavam compreendidas entre os 24 e os 39 anos, fig. 13, e as restantes corresponderam a adultos entre os 36 e os 45 anos. Predominância de mulheres representadas na amostra, 60% contra os 40% dos homens fig.14. A diferença entre os hábitos tabágicos são mais acentuadas para os não fumadores numa percentagem de 67% contra 33% de fumadores mais acentuados em mulheres jovens.

Seis destes pacientes tinham lesões activas, típicas de Herpes vírus na mucosa labial, 4 correspondiam ao género feminino e dois ao masculino.

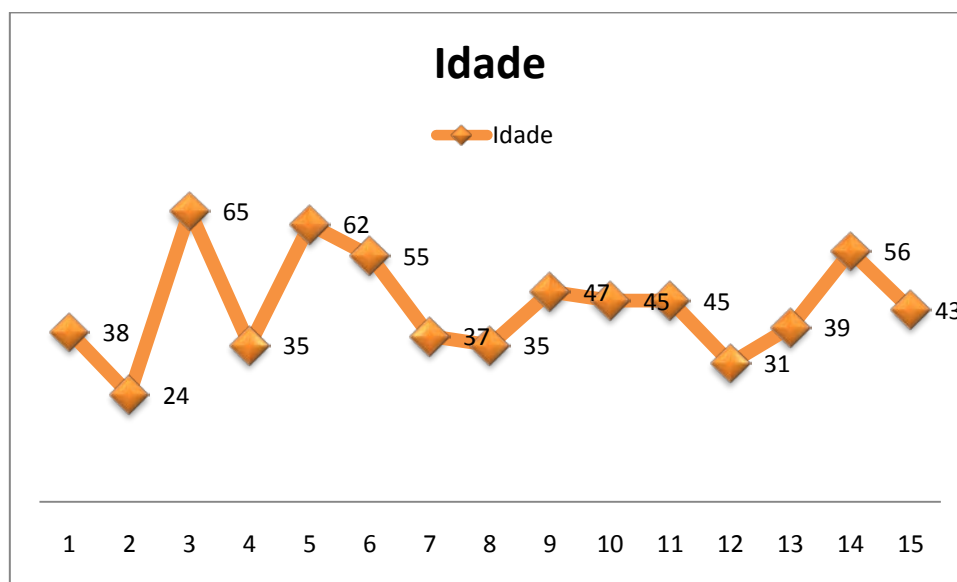


Fig.13 Representação etária da amostra

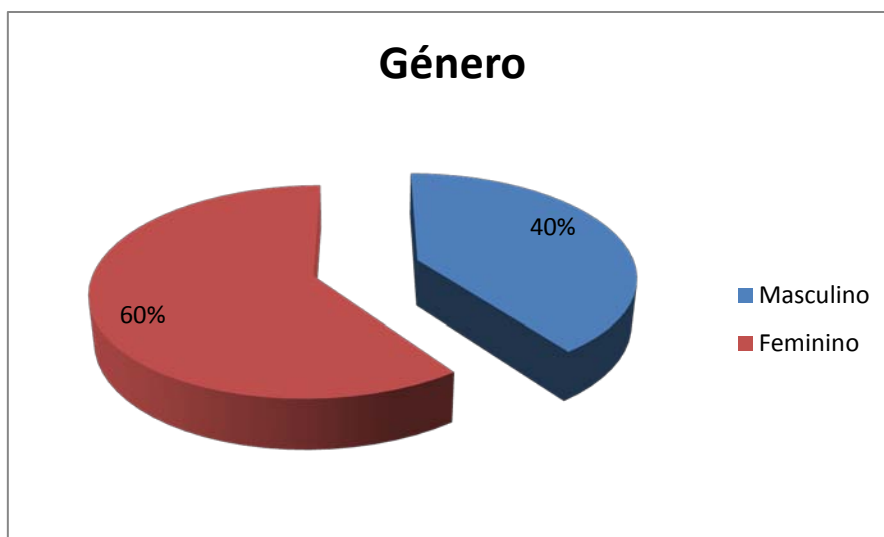


Fig.14 Representação do género em percentagem



Fig.15 Representação de hábitos em percentagem

Tabela V - Relação entre os casos clínicos, género, idade e hábitos tabágicos.

Caso	Género	Hábitos Tabágicos	Idade
1	F	Não	38
2	F	Não	24
3	M	Não	45
4	M	Sim	45
5	F	Sim	65
6	F	Não	35
7	F	Não	62
8	M	Não	31
9	M	Sim	39
10	M	Não	56
11	F	Não	55
12	F	Sim	37
13	M	Não	43
14	F	Não	35
15	F	Sim	47

F – Feminino; M – Masculino;

2 - Tipos de periodontites e complexos bacterianos

De acordo com os parâmetros clínicos aplicados por Armitage,^{3, 110} podemos classificar os casos de periodontite em três grandes grupos (Tabela VI). Podemos destacar que 10 das amostras foram classificadas no grupo das periodontites crónicas generalizadas (PCG) e as restantes no grupo das periodontites agressivas generalizadas (PAG) e periodontites agressivas generalizadas (PAL), respectivamente. Este último grupo apresentou um maior complexo bacteriano. Esta designação refere-se à

associação de diversas bactérias patogénicas periodontais por amostra e que variou no nosso estudo entre dois e nove microrganismos.

O diagnóstico clínico dos indivíduos estudados correspondeu a:

- a) Periodontite crónica generalizada (10 dos 15 casos).
- b) Periodontite agressiva generalizada (4 dos 15 casos).
- c) Periodontite agressiva localizada (1 dos 15 casos).
- d) Num dos casos de PCG não foi verificado crescimento bacteriano.

Tabela VI - Relação entre tipo de periodontite e número de bactérias associadas

Diagnóstico clínico			Nº de Bactérias periodontais diferentes
PCG	PAG	PAL	
1			9
	1		8
2	1		7
2	1	1	6
1	1		4
2			3
1			2
n=9	n=4	n=1	

PCG: Periodontite Crónica Generalizada; PAG: Periodontite Agressiva Generalizada
 PAL: Periodontite Agressiva Localizada

Na tabela VII estão detalhadas as bactérias que fazem parte destes complexos. De uma maneira geral, quase todos os pacientes com diferentes tipos de periodontite apresentaram complexas associações onde estavam incluídas as bactérias patogénicas. Destaca-se a associação das bactérias periodontais clássicas como *Aa* e *Pg* junto a *Campyl*, *Tp*, *Fuso*, *Mm*, *Eub* e *Dp*, correspondente a diferentes grupos etários e variados tipos de periodontite, formando parte dos maiores complexos (9, 8, 7 e 6 bactérias).

Na Tabela (VIII) podemos verificar a frequência individualizada das bactérias periodontopatogénicas, deste grupo de amostras. Assim, podemos salientar algumas importantes como *Aa*, bactéria ligada às Peridontites Agressivas, esteve em 3 dos 5 casos, associada a *Capnocytophaga*, e, em 3 dos 5 casos, associada à levedura *Candida albicans*. Outra bactéria ligada a variados tipos de periodontite foi *Campylobacter* spp, 8 dos 15 casos, sendo 5 de PCG e 3 de PAG.

Fusobacterium, também foi frequente nesta amostra, esteve presente em 8 dos 15 casos, dos quais 5 corresponderam a PCG e 3 a PAG.

Tabela VII - relação de complexos bacterianos, grupo etário e tipo de periodontite

ASSOCIAÇÕES OU COMPLEXOS BACTERIANOS	TIPO DE PERIODONTITE			IDADE
	PCG	PAG	PAL	
Capno + Candida	1	0	0	38
Capno + Tp + Strep β	1	0	0	24
Aa + Capno + Dp + Strep β	0	1	0	40
Campyl + Strep β + Candida	1	0	0	45
Aa + Capno + Strep β + Candida	1	0	0	65
Aa + Capno + Pg + Mm + Fuso + Candida	0	0	1	35
Capno + Campyl + Mm + Fuso + Eub + Eik	1	0	0	62
Capno + Pi + Campyl + Fuso + Eik + Strep β	1	0	0	31
Capno + Cmpyl + Strep β + Tp + Pseud + Kleb	0	1	0	39
Capno +Pg + Tp + Mm + Fuso + Dp + Actin	1	0	0	56
Capno + Pg + Campyl + Trep+ Mm + Fuso + Eub	1	0	0	55
Aa + Capn + Campyl + Mm + Fuso + Eub + Eik	0	1	0	37
Aa + Capn + Pg + Campyl + Tp + Mm + Fuso + Candida	0	1	0	43
Capn + Pg + Tf + Campyl + Mm + Fuso + Eub + Eik + Dp	1	0	0	45

Tabela VIII - Tipos de Periodontite e a sua relação com espécies bacterianas patogénicas

Tipo Periodontite (Número)	Bacterias Periodontopaticas e Levedura												
	Aa	Pg	Trep	Pi/n	Fuso	Campyl	Eub	Mm	Tf	Eik	Capno	Strept β	C. alb.
PCG (n=9)	1	3	3	1	4	5	3	4	1	3	8	2	3
PAG (n=4)	3	1	2		2	3		2		1	3	2	1
PAL (n=1)	1	1			1			1			1		1
Totais (n=14)	5	5	5	1	7	8	4	7	1	4	12	4	5

PCG, Periodontite Crónica Generalizada; PAG, Periodontite Agressiva Generalizada; PAL, Periodontite Agressiva Localizada;

3 - Sensibilidade aos antibióticos

3.1- Sensibilidade

Relativamente à susceptibilidade frente aos antibióticos, utilizando a Mínima Concentração Inibitória, (CMI) por E-Test, (Tabela IX) podemos destacar que a maior parte das bactérias foram sensíveis aos antibióticos amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico, excepto, *Capno*, *Aa*, e *Pi* que cresceram em concentrações altas MIC maior que 90,0 que significa que foram resistentes. No gráfico 16 podemos notar de forma nítida esta distribuição. As estirpes apresentaram uma maior tendência para resistência frente ao metronidazol em valores maiores de MIC igual a 90, ao contrário da maior parte das mesmas que se mostraram susceptíveis à tetraciclina, excepto em dois casos de *Pi* e *Campylo* (MIC 90). No caso de ciprofloxacina, a distribuição do MIC, foi variável.

Tabela IX - Determinação da CMI de 5 antibióticos frente às bactérias

Antibiótico	Bacterial genera	MIC range (µg/mL)	MIC ₅₀	MIC ₉₀	S	I	R
Amoxicillin (AC)	<i>Micromonas micros</i> (2)	0.125 – 0.64	1	1	1	1	0
	<i>Campylobacter sputorum</i> (7)	≤0.016 – 16	3	4	3	3	1
	<i>Capnocytophaga</i> spp (9)	≤0.016– 192	6	3	4	2	3
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (4)	≤0.016 – 16	2	2	1	2	1
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2)	≤0.016 – 3	1	1	1	1	0
	<i>Prevotella intermédia</i> (2)	≤0.016 – 16	1	1	1	0	1
Amoxicillin-Clavulanic acid (XL)	<i>Micromonas micros</i> (2)	0.125 – 0.47	1	1	1	1	0
	<i>Campylobacter sputorum</i> (7)	≤0.016 – 128	4	3	3	2	2
	<i>Capnocytophaga</i> spp (9)	≤0.016 – 28	6	3	3	3	3
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (4)	≤0.016 – 1.5	1	3	1	3	0
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2)	≤0.016 – 1	1	1	1	1	0
	<i>Prevotella intermédia</i> (2)	≤0.016 – 16	1	1	1	0	0
Metronidazole (MZ)	<i>Micromonas micros</i> (2)	≤0.016 - 32	0	2	0	2	0
	<i>Campylobacter sputorum</i> (7)	≤0.016 – 64	1	6	1	1	5
	<i>Capnocytophaga</i> spp (9)	≤0.016– 256	2	7	1	1	7
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (4)	2 – 32	1	3	0	1	3
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2)	≤0.016	2	0	2	0	0
	<i>Prevotella intermédia</i> (2)	0.094–0.125	2	0	2	0	0
Tetracycline (TC)	<i>Micromonas micros</i> (2)	0.19 – 0.64	1	1	1	1	0
	<i>Campylobacter sputorum</i> (7)	≤0.016≥256	4	3	3	2	2
	<i>Capnocytophaga</i> spp (9)	≤0.016– 256	7	2	7	1	1
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (4)	0.023 – 2.0	1	3	1	3	0
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2)	≤0.016 - 8	1	1	1	1	0
	<i>Prevotella intermédia</i> (2)	16 - 125	1	1	0	0	2
(CI) Ciprofloxacin	<i>Micromonas micros</i> (2)	1.0 – 1.5	0	2	0	2	0
	<i>Campylobacter sputorum</i> (7)	≤0.016 – 6	2	5	1	6	0
	<i>Capnocytophaga</i> spp (9)	≤0.016 – 15	5	4	4	3	2
	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> (4)	≤0.016 - 12	3	1	2	1	1
	<i>Fusobacterium nucleatum</i> (2)	0.38 – 3	1	1	1	1	0
	<i>Prevotella intermédia</i> (2)	0.5 – 1.0	1	1	1	1	0

S-sensível; I- intermédio; R-resistente

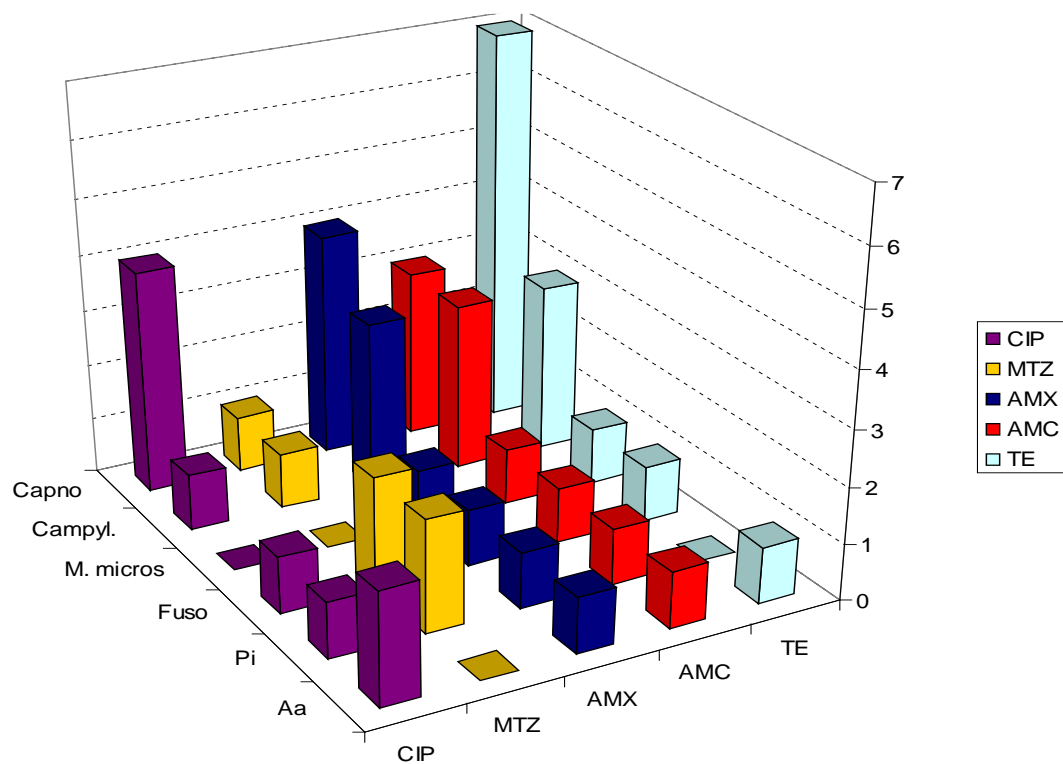


Figura 16. - Sensibilidade das bactérias periodontopáticas frente aos 5 antibióticos

3.2 Sensibilidade intermédia

No total da amostra verificou-se um importante número de amostras com sensibilidade intermédia, como podemos observar na fig. 17

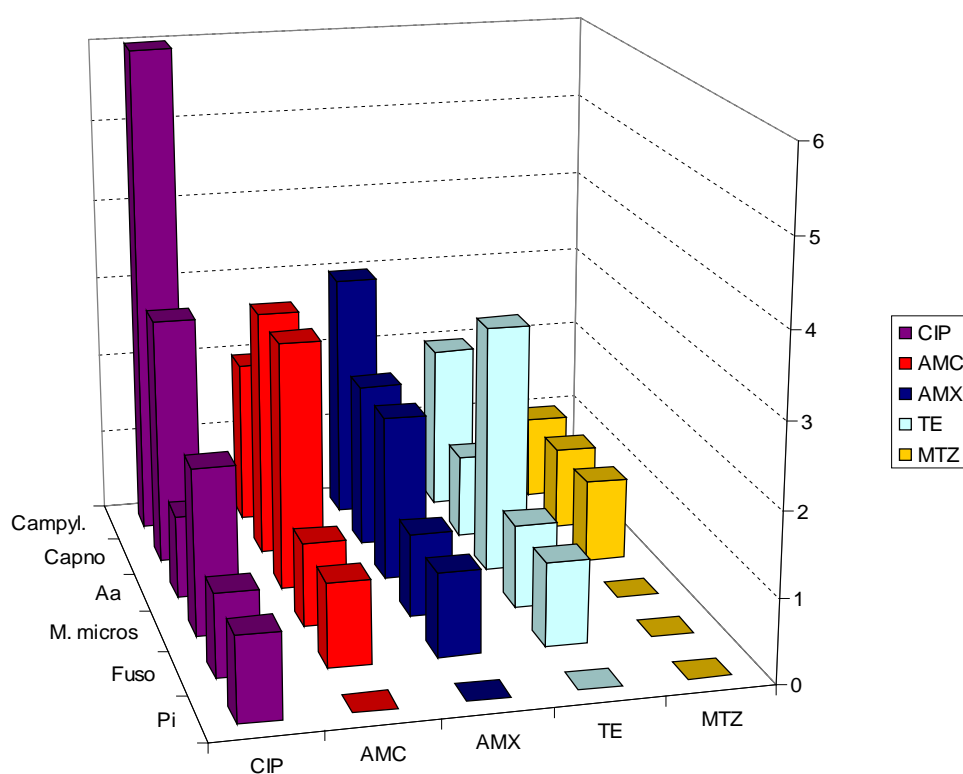


Figura 17. - Sensibilidade Intermédia das bactérias periodontopáticas frente aos 5 antibióticos

3.3- Resistência

Quanto à resistência destas espécies aos antibióticos podemos apreciar uma tendência à resistência frente ao metronidazol no que diz respeito a *Capnocytophaga* e *Campylobacter*, coincidentemente eram bactérias com resistência apreciável a amoxicilina e combinação amoxicilina com ácido clavulânico. Deve ser destacado também que a maior parte de amostras de *Aa* mostraram também certa resistência a esses mesmos antibióticos.

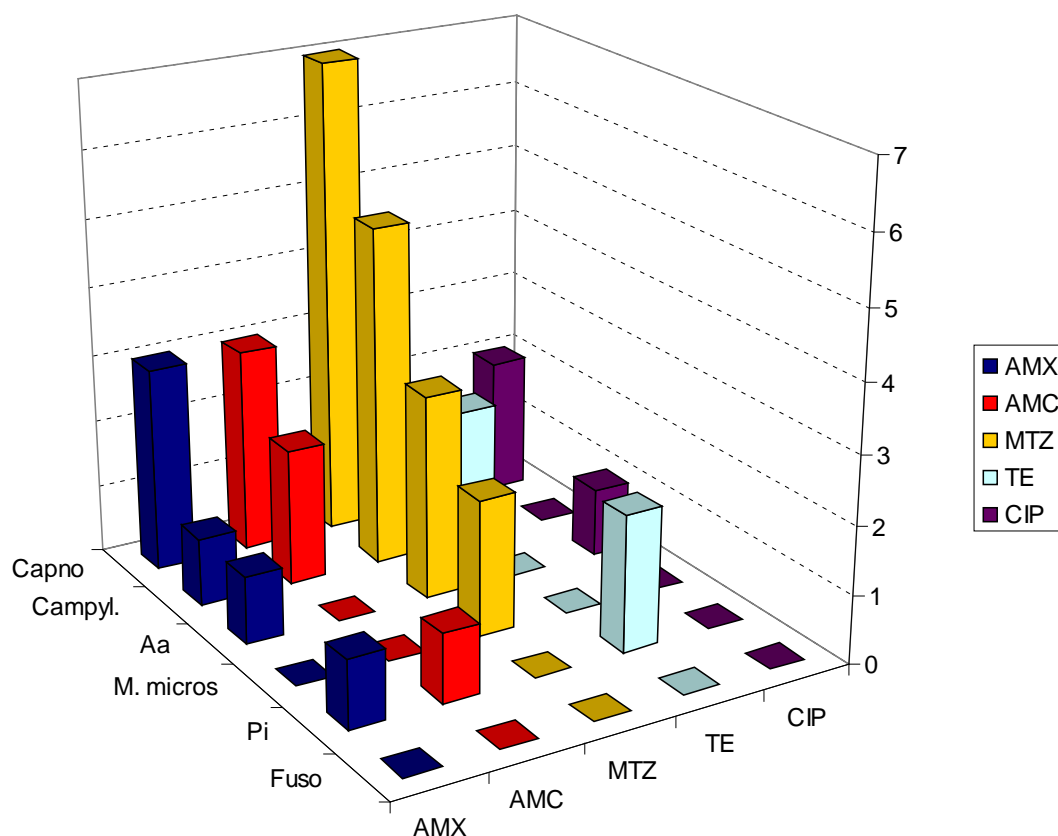


Figura 18. Resistência das bactérias periodontopáticas frente aos 5 antibióticos

VI – DISCUSSÃO

A presença de micro organismos na placa bacteriana é fundamental para o início e desenvolvimento das doenças periodontais.^{111, 112} Muitas das espécies bacterianas podem ser cultivadas de amostras obtidas do sulco gengival ou da bolsa periodontal, sendo que algumas delas parecem estar mais frequentemente associadas a certos tipos específicos de doença periodontal.^{113, 114}

Autores como Kelstrup, Theilad, em 1974¹¹⁵, partiram do princípio que a doença periodontal teria um início na gengivite e que eventualmente poderia evoluir para periodontite. De acordo com o conceito de placa bacteriana específica, diferenças na sua composição poderiam explicar as variações no padrão de destruição do periodonto. Por outro lado, foi considerado que apesar de existir uma gengivite severa caracterizada por uma significativa massa bacteriana, não necessariamente evoluía para uma periodontite, ao contrário de em outros locais com escassa placa, podia eventualmente ser verificada inflamação que levaria a uma rápida perda do nível de inserção.

Assim, as técnicas de avaliação microbiológica permitiram diferenciar a composição bacteriana da placa nas superfícies supra gengival e sub gengival, distinguindo estado de saúde e processos infecciosos tais como, gengivite e periodontite.

Determinadas espécies bacterianas parecem estar relacionadas com tipos de microorganismos responsáveis da destruição periodontal.¹¹⁶

No nosso estudo, os resultados encontrados foram idênticos aos do trabalho de Sockransky e Slots^{29, 30, 116-118}, no que concerne aos exames microscópicos directos da amostra. Assim, verificamos que nos nossos pacientes havia diferença de microflora nas lesões periodontais e nas áreas

saudáveis. Estas últimas, caracterizadas pelo predomínio de cocos e bastonetes Gram⁺, enquanto que nos locais com lesões periodontais o predomínio foi de cocos, bastonetes filamentosos e fusiformes Gram⁻; além disso verificou-se que a presença de espiroquetas, correspondeu a pacientes com periodontite destrutiva³⁵. Estas bactérias espiraladas foram evidenciadas através de uma coloração de contraste metacromático conhecida como coloração de Vagó e recomendada por Slots³⁰, para este tipo de microorganismos.

A simples presença de placa bacteriana em contacto com o periodonto, não é factor de desenvolvimento de doença periodontal, mas sim a agregação a essa placa dentária de bactérias patogénicas tais como: *Aa*, *Pg*, *Pi*, *Fn*, *Ec*, *Bf*, *Camp*, *Trep*.^{117, 119-121} estas sim, podem ser a causa da doença periodontal. Esta situação microbiológica bem definida foi ainda confirmada com o isolamento de bactérias periodontopáticas, assim foi como os autores explicam o conceito de biofilme - placa bacteriana uma associação claramente evidenciada por nós, no resultado de complexos bacterianos, situação esta que explica claramente que as bactérias patogénicas, agregadas num complexo, se encontravam numa placa evoluída em estado de biofilme, com características e potencialidade claramente patogénica, explicando bem a situação clínica de destruição tisular na lesão periodontal. Os nossos resultados e conclusões, vêm se assim reforçados pela semelhança com os achados pelos autores acima mencionados.

Entretanto, para Zambom et al.¹²², em 1996, não é só a presença de uma ou mais espécies patogénicas, que está associadas à progressão da doença, mas, é também a relação existente entre o agente patogénico e hospedeiro. Isto é, há uma relação de causa -efeito. Para este autor não é importante a quantidade de bactérias, mas sim o efeito produzido pelos agentes patogénicos no periodonto. Assim, seriam as toxinas e produtos

metabólicos das bactérias e outras enzimas, que teriam um efeito de resposta inflamatória severa do paciente. Esta análise, do autor, foi evidenciada pelo exame clínico dos pacientes que estudamos, em que todos os parâmetros, que foram aplicados no diagnóstico, definiram bem o grau de destruição periodontal. Essa destruição seria a conjugação de reacções inflamatórias onde se activam vários componentes inflamatórios tais como: enzimas que podem destruir os tecidos ou interferir com a actividade de defesa do hospedeiro^{111, 120}. Substâncias tóxicas e metabolitos de baixo peso-molecular são constantemente libertados do biofilme e vão promover efeitos destrutivos directamente sobre o epitélio, podendo penetrar no tecido conjuntivo, interagindo com pequenos vasos e células do hospedeiro, induzindo ao processo inflamatório. A inflamação pode promover a destruição tecidual devido à libertação de enzimas proteolíticas, provenientes de células fagocitárias e outras células do hospedeiro¹¹¹. As citocinas provenientes da inflamação como, a IL-1 α , o TNF β , o interferon- β (IFN- β), induzem e aumentam a produção de prostaglandinas, principalmente PGE₂, que vão mediar a reabsorção do osso alveolar. Enzimas conhecidas como matriz metaloproteases (MMPs) vão mediar a destruição dos componentes da matriz extra-celular da gengiva e do ligamento periodontal, sendo os macrófagos e os fibroblastos a principal fonte de PGE₂ e MMPs Além disso, substâncias citotóxicas bacterianas, linfocinas, provavelmente afectam a capacidade dos fibroblastos em manter a formação de fibras de colagénio¹¹⁵.

Muitos autores tem demonstrado a presença dos vírus do grupo Herpes (*Herpes simplex vírus, Citomegalovírus e Epstein Barr*), na doença periodontal associado a doenças hereditárias, como a de Papillon-Lefèvre Velazco et al. 1999¹²³ e em casos de periodontites severas, quanto o grau de destruição tecidual, associadas a bactérias patogénicas de conhecida virulência na patologia periodontal Slots & Contreras 2000¹²⁴, Slots

2004¹²⁵. Também tem sido demonstrado a ausência destes vírus e bactérias após tratamento mecânico e terapia antibiótica Pacheco et al, 2002.¹²⁶

Por outro lado Slots 2010⁴¹, numa extensa e importante revisão científica, refere que alguns mecanismos imunes que estão activos contra os vírus, podem diminuir a resposta imune antibacteriana e vice-versa, facto que pode indicar que as periodontites são resultado de uma extensiva e parcialmente oposta resposta imune contra a acção combinada vírus – bactéria.

Cabe assinalar que neste grupo de pacientes estudados, foi verificado que seis dos quinze pacientes estudados, apresentavam concomitantemente, uma infecção activa a Herpes vírus na mucosa labial e bactérias periodontais típicas patogénicas

A susceptibilidade do hospedeiro e condições ambientais locais, como a carga oclusal, associadas a determinadas bactérias, podem promover a perda de inserção progressiva.

Os pacientes com os diversos tipos de periodontite, foram tratados, imediatamente, depois da colheita para análise microbológica, utilizando procedimentos mecânicos. Segundo Smith¹²⁷, as doenças periodontais podem ser controladas pela supressão de algumas espécies de microrganismos da placa sub gengival, que são consideradas patogénicas, e pela interferência na recolonização destes locais por estas bactérias. Com o intuito de bloquear, ou ao menos retardar, a progressão da doença periodontal, que resulta na destruição dos tecidos de suporte, os procedimentos de raspagem e alisamento radicular (RAR) são considerados a conduta principal no tratamento destas infecções.¹²⁸ No entanto, tem-se observado que o desbridamento mecânico cirúrgico, usualmente, não erradica microrganismos patogénicos periodontais devido ao potencial invasivo destas bactérias, para as células epiteliais e tecido conjuntivo sub epitelial. Além disso, a recolonização da microbiota subgengival após

raspagem e alisamento radicular, pode ocorrer vários meses após, particularmente quando associados ao controle da placa subgengival, sendo que, algumas espécies bacterianas recolonizam bolsas periodontais profundas após 140 a 224 dias, mesmo com as múltiplas sessões de raspagem e alisamento radicular e controle de placa meticuloso,¹²⁹ presumivelmente, devido à presença de placa bacteriana residual não removida pelo desbridamento mecânico. Para intensificar a acção da raspagem e alisamento radicular no tratamento das periodontites, foi proposto o emprego de agentes antimicrobianos sistémicos^{49, 130}

A eficácia no tratamento periodontal está relacionada com supressão dos microorganismos patogénicos e a recolonização desses sítios, por uma microbiota relacionada com saúde periodontal.¹³¹

Para potencializar o efeito da RAR, diversas terapêuticas associadas tem ido propostas, como os antibióticos sistémicos e a remoção química ou mecânica profissional de placa supra gengival^{14, 132} procedimento esse, realizado no departamento de Periodontologia do qual o material analisado é proveniente.

Outros estudos que utilizaram o protocolo seguido neste trabalho com controlo químico da placa supra gengival como parte efectiva da terapêutica periodontal sugerem que a associação destes procedimentos à RAR tem influência positiva na composição da placa sub gengival, além de proporcionar melhoria nos parâmetros clínicos periodontais.^{133, 134}

Este estudo, começou por caracterizar clinicamente os pacientes com doença periodontal, aplicando os parâmetros internacionalmente reconhecidos^{110, 135, 136}. De um modo geral, a periodontite crónica e agressiva, compartilham diversos aspectos clínicos, mas os detalhes específicos do curso da doença, não são necessariamente idênticos em ambas as formas. No entanto, está bem estabelecido que ambas são infecções complexas que podem ocorrer em hospedeiros susceptíveis e são

causadas por biofilmes que se formam na superfície dos dentes.^{73, 117}

Em ambos os casos, o biofilme compreende microorganismos que são os componentes da flora indígena normal da microbiota oral.² Em associação à reacção imuno-inflamatória do hospedeiro, a presença dos biofilmes é um dos principais responsáveis pela perda de inserção periodontal e osso alveolar de suporte dos dentes.¹²²

Os mediadores pró-inflamatórios parecem ser o foco de atenção, neste momento em que a resposta do hospedeiro se mostra determinante na intensidade da destruição periodontal. A procura dos factores que estariam a estimular a produção inadequada de citocinas, em processos inflamatórios, levou à investigação dos genes responsáveis pela sua produção. Assim, a busca de marcadores genéticos, que permitam a detecção de indivíduos com maior probabilidade de desenvolver a doença, é fundamental para a prevenção da instalação do processo destrutivo, ou para a instauração de uma terapêutica individualizada e preservação adequada de pacientes, nos quais, sinais clínicos da doença já se manifestaram. Sendo a doença periodontal multifactorial e complexa, quanto mais genes forem considerados, mais efectivo será o diagnóstico¹²². A clarificação do diagnóstico foi baseada nos estudos de Armitage¹¹⁰, seguindo a idade de início, taxas de progressão, padrões de destruição, sinais clínicos de inflamação e formação de placa e tártaro.

A metodologia laboratorial adoptada foi a convencional, como a recomendada por vários autores^{135, 136} e baseada especialmente nos métodos referidos por Slots³⁰, utilizando os testes para identificação presuntiva das bactérias tais como: o teste da catalase para *Aa.* e a detecção de algumas enzimas das bactérias pigmentadas.

O exame qualitativo e quantitativo da amostra, através de diluições, permitiu determinar a concentração e a percentagem de bactérias em relação ao total existente na flora presente na amostra estudada.

Os nossos resultados foram consistentes com os encontrados por outros autores sobre as associações específicas entre as bactérias no biofilme dentário e a presença de certos complexos de bactérias com diferentes formas de periodontite.^{137 73 138} Deve ser também considerado que as bactérias periodontopatogênicas, assim como a susceptibilidade a antibióticos, pode variar em diferentes áreas geográficas¹³⁷, de acordo com os hábitos terapêuticos¹³⁹. A eficácia de antibióticos específicos na doença periodontal tem sido suficientemente esclarecida, pois os parâmetros clínicos e os métodos de susceptibilidade muitas vezes não foram adequadamente avaliados, devido, por um lado à dificuldade de reprodutibilidade e de viabilidade destas bactérias e à falta de outros exames microbiológicos, quando o profissional da saúde oral trata seus pacientes.

A doença periodontal é geralmente controlada por tratamento mecânico mas em alguns casos é recomendável o uso de antibiótico. A questão que se põe é qual o antibiótico recomendado? Considerando que a infecção é resultante da acção de bactérias patogénicas que se encontram associadas a outras espécies bacterianas em estado de biofilme mas que, o que se pretende é que o antibiótico aceda ao alvo das bactérias patogénicas e nessa acção também atingir as não patogénicas e assim provocar uma ruptura dos agregados bacterianos no biofilme. Ainda neste sentido continua a questão que se põe sobre a concentração do antibiótico a ser utilizado no tratamento, tendo em conta que o recomendado era bem menor para essa bactéria que está em estado de biofilme e nesse caso requereria de uma concentração bem mais elevada, pelas modificações de resistência que vai adquirindo nesse estado Socransky SS, Haffajee.²

Os agregados de diferentes espécies bacterianas isolados dos pacientes estudados e a multiresistência encontrada, nas espécies periodontopáticas isoladas, poderiam explicar bem o estado de agregação e

co-agregação típico de biofilme, em que se encontravam na amostra. A este facto podemos acrescentar a existência da matriz que envolve os agregados bacterianos composto de viscosidade própria do glicocalix bacteriano (cápsula e pequenas camadas viscosas que rodeiam a parede de algumas bactérias) e produtos metabólicos finais das bactérias. Este conjunto de situações exerce grande influência na diminuição da capacidade de acção do antibiótico.

Outro aspecto a realçar é a actuação do antibiótico na fase de crescimento exponencial e não na fase de latência, estado este em que se encontra no biofilme. Sedlacek et al. 2007,¹⁴⁰ demonstraram “in vitro” que a concentração de antibiótico, requerida pelas bactérias patogénicas se diferenciava claramente quando elas cresciam em forma planctónica, isto é em forma individual, que quando o tratamento era feito associado com um conjunto de outras espécies. Os antibióticos utilizados pelos autores, foram a tetraciclina, a amoxicilina, a amoxicilina/ácido clavulânico, o metronidazol, entre outros. Eles verificaram um aumento até 4 vezes da concentração de antibiótico requerida em estado de biofilme¹⁴⁰.

Bidault et al.⁹⁹ concordam com a prática de ser fundamental um tratamento mecânico no sentido de desbridar a área infectada e só depois acompanhar o tratamento com antibiótico, porque do contrário não actua o antibiótico. Por outro lado, consideram os mesmos autores que o aparecimento de resistência das bactérias aos antibióticos é um processo dinâmico - biológico, o que quer dizer que nos hábitos de tratamento é importante considerar este aspecto da necessidade de acompanhar através de testes a evolução da resistência. Não podemos esquecer o mecanismo que utiliza a bactéria frente aos antibióticos mais prescritos na prática de terapêutica periodontal. Os mecanismos de resistência das bactérias frente aos antibióticos mais utilizados na terapêutica periodontal, estão bem explicados na tabela IX⁹⁹. Além do mecanismo de resistência há que

considerar por outro lado a aleatoriedade no tempo de antibioterapia. Outro aspecto a considerar, é a repetição da prescrição dos mesmos antibióticos em concentrações baixas que resulta numa contínua selecção das estirpes resistentes das espécies bacterianas periodontais.

Em relação à resistência das nossas amostras frente aos antibióticos podemos salientar que a pesar de terem sido em menor número, as espécies bacterianas periodontais mostraram uma tendência de resistência à amoxicilina, à amoxicilina / ácido clavulânico (11 estirpes de 6 espécies estudadas respectivamente) e ao metronidazol (17 estirpes de 6 espécies estudadas). Cinco destas espécies eram Gram-, pertencentes a *Campylobacter* spp, *Aa.*, *Pi* e *Capnocytophaga*. Sabe-se que a produção de β -lactamase é frequentemente observada entre bactérias Gram- do género *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga*. Esta enzima é mais frequentemente encontrada em bolsas periodontais maior que 3mm¹⁴¹. Uma espécie é considerada resistente quando não é afectada por uma concentração de antibiótico normalmente utilizada para eliminar a espécie.

Devido a todos estes mecanismos de resistência discutidos e ao efeito terapêutico que as mudanças bacterianas vêm mostrando, assim como também a sua repercussão no tratamento é cada vez mais mencionado o conceito da utilização tópica do antibiótico no local da lesão, especialmente no conceito de estado de biofilme¹⁴²

Há trabalhos que abordam o tratamento das periodontites com determinados antibióticos, relativamente aos testes de susceptibilidade.

Contudo, não há uma standardização relativamente às concentrações que definam resistência e/ou susceptibilidade quando se determina a CMI do antibiótico. Alguns autores, como Tomas et al. 2007 seguem as recomendações do Clinical and Laboratory standards Institute para a interpretação qualitativa dos resultados¹⁴³. Os critérios que nós

adoptámos para definir a susceptibilidade estiveram baseados em trabalhos dos autores Kuriyama et al.¹³⁹ e os resultados foram consistentes na definição de susceptibilidade.

No nosso estudo, o *F. nucleatum* foi susceptível à amoxicilina / ácido clavulânico e à ciprofloxacina (Tabela VIII). Isto está de acordo com trabalhos anteriores,^{144, 145} embora a resistência à penicilina permaneça incomum entre o *Fusobacterium*^{146, 147}, sendo que algumas das cepas de *F. nucleatum* foram resistentes à amoxicilina. Isto está de acordo com os resultados de Mosca et al.¹³⁹ que encontraram resistência em 12,5% das cepas de *F. nucleatum*. De acordo com King et al.¹⁴⁸ foi facilmente identificado o mecanismo de resistência às β -lactamases. Em contrapartida, uma grande maioria dos microorganismos isolados não foram sensíveis ao metronidazol.

Lakhssassi et al.¹⁴⁵ e Winkelhoff van et al.¹⁴⁹ relataram resistências de 33% e 20%, respectivamente, de *F. nucleatum* para o metronidazol, que foi menor do que o registado no nosso estudo. No entanto, outros pesquisadores¹⁴⁷, investigaram amostras periodontais de pacientes que vivem em uma área seleccionada do sul da Itália e mostraram que todas as cepas de *F. nucleatum* analisadas foram sensíveis ao metronidazol.

À semelhança de *F. nucleatum*, as cepas de *Prevotella* spp. também eram muito susceptíveis à amoxicilina/ácido-clavulânico e à ciprofloxacina, e resistentes à amoxicilina, à clindamicina e ao metronidazol, só havendo uma (1) resistência à amoxicilina e à amoxicilina/ácido clavulânico e duas (2) à tetraciclina (tabela IX) que é geralmente considerada como altamente eficaz contra espécies de *Prevotella*.¹⁵⁰ No entanto, à semelhança do presente estudo, resistências à amoxicilina e ao metronidazol foram relatadas em estudos anteriores^{145, 151}. Curiosamente, foi detectada uma resistência relativamente alta a estes antibióticos comparados com os resultados de outros estudos noutras zonas

do globo.^{145, 152}. As cepas *Prevotella* spp são conhecidas por produzir β -lactamases¹⁵³. Isso pode explicar, em parte, a sua resistência à amoxicilina. Neste estudo, quase todos os microorganismos isolados foram sensíveis à amoxicilina / ácido clavulânico. Em contrapartida, conforme relatado por outros autores, a proporção de microrganismos isolados com resistência aos antibióticos pode ser atribuída principalmente ao grau de utilização de antibióticos em diferentes países.

O *Aa* foi a espécie menos susceptível aos antibióticos como a amoxicilina / ácido clavulânico, e sendo a ciprofloxacina o antibiótico mais eficaz (Tabela 6). A alta susceptibilidade a estes dois antibióticos é corroborada pelos resultados de outros estudos^{144, 149, 154, 155}. Descobrimos também que os antibióticos menos eficazes foram a amoxicilina, e o metronidazol. Isto está de acordo com os estudos de van Winkelhoff et al. (40) e Kulik et al.¹⁵⁴, onde 33,3%, 72% e 82% do *Aa* isolados foram resistentes à amoxicilina, ao metronidazol e à clindamicina, respectivamente. Como se observa em nossos resultados, mais uma vez, os valores de resistência aos antibióticos encontrados no nosso estudo foram superiores. Deve ser lembrado que *Aa*, é uma bactéria capnofílica e o metronidazol, um antibiótico recomendado para as bactérias anaeróbicas.

Por outro lado, sabe-se que o metabolito hidroxilado do metronidazol é de três a quatro vezes mais activo contra o *Aa* e que actua em sinergia com a amoxicilina contra esse patógeno. Por esta razão, o metronidazol, em combinação com a amoxicilina, tem demonstrado ser eficaz no tratamento da doença periodontal¹⁵⁶. No entanto, o valor MIC90 (> 256 mg / mL) do *Aa*, relatado por van Winkelhoff et al.¹⁵⁷ indica que a eficácia clínica desta terapia de combinação pode não ser tão eficaz em Espanha como noutros países europeus. Situações semelhantes podem eventualmente ocorrer em Portugal. Estudos anteriores, comparando diferentes populações europeias com diferentes níveis de consumo de antibióticos, fundamentam a opinião

de que as directrizes padrão de uso de antimicrobianos no tratamento de infecções periodontais, não devem ser recomendados, devido a existir grandes diferenças no perfil de antimicrobianos dos principais patógenos periodontais encontrados^{130, 149}. O nível de resistência varia entre os países, podendo ser atribuído ao uso de diferentes antibióticos¹⁴². Entre os países europeus, a Suíça é o país com o menor consumo de antibióticos¹⁵⁸, o que pode em parte explicar porque a resistência aos antibióticos não aumentou entre os microorganismos isolados da área de Basileia.

Os resultados sugerem que a ciprofloxacina, um antibiótico de amplo espectro, tem uma potente actividade antibacteriana contra patógenos, o que é comparável com a de da amoxicilina / ácido clavulânico e maior do que a do metronidazol e da amoxicilina. Isto poderia ser explicado pelo baixo número de profissionais ainda a não usar indiscriminadamente ciprofloxacina para o tratamento das infecções dentárias.

A resistência de periodontopatógenos à amoxicilina/ácido clavulânico, metronidazol e amoxicilina, observada no presente estudo, merece atenção especial, pois estes antibióticos são frequentemente usados como antibióticos coadjuvantes no tratamento periodontal¹³². Sedlacek & Walker¹⁴⁰ demonstraram que uma quantidade significativamente maior de drogas será necessária para ter um efeito inibitório no biofilme de bactérias em estado planctónico da mesma estirpe. Isso deve ser levado em conta quando os antibióticos são usados como adjuvantes à terapia periodontal, principalmente em populações com alta resistência aos antibióticos.

VII - CONCLUSÕES

Os resultados do estudo sugerem que os microrganismos periodontais em pacientes com periodontite crónica podem ser resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados na terapia infecciosa periodontal. O uso indiscriminado de antimicrobianos pode resultar no surgimento de cepas mais resistentes aos antibióticos de bactérias associadas a doenças periodontais na população portuguesa em comparação com as populações de outros países.

Os nossos resultados também corroboram a ideia de que o uso de antibióticos deve ser baseado em testes de susceptibilidade, em vez de um regime único adjuvante antimicrobiano. Estes resultados poderiam ter um impacto no tratamento periodontal, principalmente no que diz respeito à selecção como adjuvante de antibióticos sistémicos em população que precisam ser tratadas com antibiótico. Mais estudos são necessários para investigar as variações geográficas da resistência a antimicrobianos da microbiota periodontal a nível mundial.

A prevalência de multi-resistência continua a aumentar entre muitos patógenos, principalmente por causa do uso excessivo e mau uso de agentes antimicrobianos. Tal utilização não só aumenta o custo dos cuidados médicos, mas também desnecessariamente expõe o paciente à toxicidade e aos riscos potenciais que promovem o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos em unidades de saúde.

As bactérias identificadas neste estudo, se bem que pouco representativas numericamente, têm sido excelentes indicadoras de diversas situações clínicas que ajudaram a elucidar vários aspectos com que se enfrenta para a compreensão da doença periodontal.

Pode-se dizer que serviu para detectar um conjunto de informações incontornáveis quando se quer aplicar dois conceitos fundamentalmente básicos na doença: o aspecto clínico e o aspecto microbiológico e como é importante ter absoluta consonância e conhecimento da problemática da doença.

VIII - BIBLIOGRAFIA

1. Kolenbrander PE, London J. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* 1993;175(11):3247-52.
2. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol 2000* 2002;28:12-55.
3. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol* 1999;4(1):1-6.
4. Guyton AC. An author's philosophy of physiology textbook writing. *Am J Physiol* 1998;274(6 Pt 2):S1-5.
5. Friedman L. The periodontal health of the United States adult population. *J Houston Dist Dent Soc* 1988:29.
6. Heasman PA, Seymour RA. An association between long-term non-steroidal anti-inflammatory drug therapy and the severity of periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1990;17(9):654-8.
7. Deasy PB, Collins AE, MacCarthy DJ, Russell RJ. Use of strips containing tetracycline hydrochloride or metronidazole for the treatment of advanced periodontal disease. *J Pharm Pharmacol* 1989;41(10):694-9.
8. Listgarten MA. Pathogenesis of periodontitis. *J Clin Periodontol* 1986;13(5):418-30.
9. Mombelli A. Periodontitis as an infectious disease: specific features and their implications. *Oral Dis* 2003;9 Suppl 1:6-10.
10. Steinberg D, Friedman M, Soskolne A, Sela MN. A new degradable controlled release device for treatment of periodontal disease: in vitro release study. *J Periodontol* 1990;61(7):393-8.
11. Bascones-Martinez A, Figuero-Ruiz E. Periodontal diseases as bacterial infection. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2004;9 Suppl:101-7; 92-00.
12. Haffajee AD, Socransky SS. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:78-111.
13. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontol 2000* 2005;38:9-12.
14. Haffajee AD, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23(3):196-205.
15. Slots J. Microbiology in periodontics. *Tandlaegebladet* 1986;90(18):794-8.
16. Slots J. Virulence factors of the bacteria that cause periodontal diseases. *Compend Contin Educ Dent* 1986;7(9):665-8, 70.
17. Asikainen S, Chen C, Slots J. Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycescomitans* and *Porphyromonas*

- gingivalis in families with periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1996;11(6):387-94.
18. Grossi SG, Zambon JJ, Ho AW, Koch G, Dunford RG, Machtei EE, et al. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol* 1994;65(3):260-7.
 19. Slots J, Bragd L, Wikstrom M, Dahlen G. The occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* in destructive periodontal disease in adults. *J Clin Periodontol* 1986;13(6):570-7.
 20. Slots J, Kamma JJ. General health risk of periodontal disease. *Int Dent J* 2001;51(6):417-27.
 21. Pallasch TJ, Slots J. Oral microorganisms and cardiovascular disease. *J Calif Dent Assoc* 2000;28(3):204-14.
 22. Nesse W, Spijkervet FK, Abbas F, Vissink A. [Links between periodontal disease and general health. 1. Pneumonia and cardiovascular disease]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 2006;113(5):186-90.
 23. Ordovas JM, Mooser V. Metagenomics: the role of the microbiome in cardiovascular diseases. *Curr Opin Lipidol* 2006;17(2):157-61.
 24. van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000 1996;10:45-78.
 25. van Winkelhoff AJ. Antibiotics in periodontics: are we getting somewhere? *J Clin Periodontol* 2005;32(10):1094-5.
 26. van Winkelhoff AJ. Microbiology in diagnosis and treatment planning in periodontics. *Int J Dent Hyg* 2003;1(3):131-7.
 27. Pallasch TJ. Global antibiotic resistance and its impact on the dental community. *J Calif Dent Assoc* 2000;28(3):215-33.
 28. Gilbert P. Global antibiotic resistance and its impact on the dental community. *J N J Dent Assoc* 2000;71(4):11, 72-3.
 29. Hartroth B, Seyfahrt I, Conrads G. Sampling of periodontal pathogens by paper points: evaluation of basic parameters. *Oral Microbiol Immunol* 1999;14(5):326-30.
 30. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral Microbiol Immunol* 1986;1(1):48-57.
 31. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol* 2000;54:413-37.
 32. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ, Jr. Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002;66(3):486-505, table of contents.

33. Haffajee AD, Teles RP, Patel MR, Song X, Veiga N, Socransky SS. Factors affecting human supragingival biofilm composition. I. Plaque mass. *J Periodontol* 2009;44(4):511-9.
34. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol* 2000 2005;38:135-87.
35. Socransky SS, Smith C, Haffajee AD. Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *J Clin Periodontol* 2002;29(3):260-8.
36. Loesche WJ, Syed SA, Morrison EC, Kerry GA, Higgins T, Stoll J. Metronidazole in periodontitis. I. Clinical and bacteriological results after 15 to 30 weeks. *J Periodontol* 1984;55(6):325-35.
37. Lucas JJ, Loutsch E, Frances RJ. The drug addict as chronic patient. *Psychiatr Med* 1985;3(4):427-44.
38. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontol* 2000 2004;36:14-26.
39. Slots J, Sugar C, Kamma JJ. Cytomegalovirus periodontal presence is associated with subgingival *Dialister pneumosintes* and alveolar bone loss. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17(6):369-74.
40. Slots J, Saygun I, Sabeti M, Kubar A. Epstein-Barr virus in oral diseases. *J Periodontol* 2006;41(4):235-44.
41. Slots J. Herpesviral-bacterial interactions in periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2010;52(1):117-40.
42. Slots J, Sabeti M, Simon JH. Herpesviruses in periapical pathosis: an etiopathogenic relationship? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96(3):327-31.
43. Slots J. Oral viral infections of adults. *Periodontol* 2000 2009;49:60-86.
44. Van Dyke TE, Bartholomew E, Genco RJ, Slots J, Levine MJ. Inhibition of neutrophil chemotaxis by soluble bacterial products. *J Periodontol* 1982;53(8):502-8.
45. Slots J, Zambon JJ, Rosling BG, Reynolds HS, Christersson LA, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Association, serology, leukotoxicity, and treatment. *J Periodontol* 1982;17(5):447-8.
46. Rams TE, Listgarten MA, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* subgingival presence, species-specific serum immunoglobulin G antibody levels, and periodontitis disease recurrence. *J Periodontol* 2006;41(3):228-34.
47. Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol* 2000 2002;28:106-76.
48. Lundstrom A, Johansson LA, Hamp SE. Effect of combined systemic antimicrobial therapy and mechanical plaque control in

- patients with recurrent periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1984;11(5):321-30.
49. Slots J, Rams TE. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *J Clin Periodontol* 1990;17(7 (Pt 2)):479-93.
 50. Golub LM. Reduction with tetracyclines of excessive collagen degradation in periodontal and other diseases. *N Y State Dent J* 1990;56(5):24-6.
 51. Slots J. Systemic antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2004;75(11):1553-65.
 52. Golub LM, Ciancio S, Ramamamurthy NS, Leung M, McNamara TF. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *J Periodontol Res* 1990;25(6):321-30.
 53. Golub LM, McNamara TF, Ryan ME, Kohut B, Blieden T, Payonk G, et al. Adjunctive treatment with subantimicrobial doses of doxycycline: effects on gingival fluid collagenase activity and attachment loss in adult periodontitis. *J Clin Periodontol* 2001;28(2):146-56.
 54. Genco RJ. Antibiotics in the treatment of human periodontal diseases. *J Periodontol* 1981;52(9):545-58.
 55. Roberts MC, Moncla BJ. Tetracycline resistance and TetM in oral anaerobic bacteria and *Neisseria perflava*-*N. sicca*. *Antimicrob Agents Chemother* 1988;32(8):1271-3.
 56. Listgarten MA. Rationale for using microbiological diagnosis as an adjunct to periodontal treatment. *Penn Dent J (Phila)* 1993;92(1-2):5-6.
 57. Lindhe J, Liljenberg B, Adielson B, Borjesson I. Use of metronidazole as a probe in the study of human periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1983;10(1):100-12.
 58. Britt MR, Pohlod DJ. Serum and crevicular fluid concentrations after a single oral dose of metronidazole. *J Periodontol* 1986;57(2):104-7.
 59. Loesche WJ. The therapeutic use of antimicrobial agents in patients with periodontal disease. *Scand J Infect Dis Suppl* 1985;46:106-14.
 60. Loesche WJ. The role of spirochetes in periodontal disease. *Adv Dent Res* 1988;2(2):275-83.
 61. Polson AM, Garrett S, Stoller NH, Bandt CL, Hanes PJ, Killoy WJ, et al. Multi-center comparative evaluation of subgingivally delivered sanguinarine and doxycycline in the treatment of periodontitis. II. Clinical results. *J Periodontol* 1997;68(2):119-26.
 62. Sanders CC. Ciprofloxacin: in vitro activity, mechanism of action, and resistance. *Rev Infect Dis* 1988;10(3):516-27.

63. Slots J, Feik D, Rams TE. In vitro antimicrobial sensitivity of enteric rods and pseudomonads from advanced adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5(5):298-301.
64. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J* 1996;29(2):118-24.
65. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29(2):125-30.
66. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000* 1994;5:66-77.
67. van Winkelhoff AJ, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol 2000* 2005;39:40-52.
68. Aitken S, Birek P, Kulkarni GV, Lee WL, McCulloch CA. Serial doxycycline and metronidazole in prevention of recurrent periodontitis in high-risk patients. *J Periodontol* 1992;63(2):87-92.
69. Walker CB, Gordon JM, Magnusson I, Clark WB. A role for antibiotics in the treatment of refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993;64(8 Suppl):772-81.
70. Kulkarni GV, Lee WK, Aitken S, Birek P, McCulloch CA. A randomized, placebo-controlled trial of doxycycline: effect on the microflora of recurrent periodontitis lesions in high risk patients. *J Periodontol* 1991;62(3):197-202.
71. Vandekerckhove BN, Quirynen M, van Steenberghe D. The use of tetracycline-containing controlled-release fibers in the treatment of refractory periodontitis. *J Periodontol* 1997;68(4):353-61.
72. Mandell RL, Tripodi LS, Savitt E, Goodson JM, Socransky SS. The effect of treatment on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis. *J Periodontol* 1986;57(2):94-9.
73. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL, Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):134-44.
74. Asikainen S, Jousimies-Somer H, Kanervo A, Saxen L. The immediate efficacy of adjunctive doxycycline in treatment of localized juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol* 1990;35 Suppl:231S-34S.
75. Christersson LA, Zambon JJ. Suppression of subgingival *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol* 1993;20(6):395-401.

76. Slots J, Rosling BG. Suppression of the periodontopathic microflora in localized juvenile periodontitis by systemic tetracycline. *J Clin Periodontol* 1983;10(5):465-86.
77. Slots J. Selective medium for isolation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Clin Microbiol* 1982;15(4):606-9.
78. Slots J, Feik D, Rams TE. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedius* in human periodontitis: age relationship and mutual association. *J Clin Periodontol* 1990;17(9):659-62.
79. Socransky SS, Haffajee AD, Ximenez-Fyvie LA, Feres M, Mager D. Ecological considerations in the treatment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* periodontal infections. *Periodontol* 2000 1999;20:341-62.
80. Loesche WJ, Lopatin DE, Giordano J, Alcoforado G, Hujoel P. Comparison of the benzoyl-DL-arginine-naphthylamide (BANA) test, DNA probes, and immunological reagents for ability to detect anaerobic periodontal infections due to *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Bacteroides forsythus*. *J Clin Microbiol* 1992;30(2):427-33.
81. 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* 1996;11(4):266-73.
82. Rams TE, Feik D, Listgarten MA, Slots J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992;7(1):1-6.
83. Contreras A, Doan N, Chen C, Rusitanonta T, Flynn MJ, Slots J. Importance of *Dialister pneumosintes* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(4):269-72.
84. Listgarten MA. Microbiological testing in the diagnosis of periodontal disease. *J Periodontol* 1992;63(4 Suppl):332-7.
85. Krigar DM, Kaltschmitt J, Krieger JK, Eickholz P. Two subgingival plaque-sampling strategies used with RNA probes. *J Periodontol* 2007;78(1):72-8.
86. Listgarten MA. Monitoring the periodontal microbiota as an adjunct to periodontal therapy: rationale, interpretation of test results and application to patient management. *Alpha Omegan* 1992;85(4):49-53.
87. Loesche WJ, Bretz WA, Kerschensteiner D, Stoll J, Socransky SS, Hujoel P, et al. Development of a diagnostic test for anaerobic periodontal infections based on plaque hydrolysis of benzoyl-DL-arginine-naphthylamide. *J Clin Microbiol* 1990;28(7):1551-9.
88. Hooper DC. Clinical applications of quinolones. *Biochim Biophys Acta* 1998;1400(1-3):45-61.

89. Loesche WJ, Syed SA, Schmidt E, Morrison EC. Bacterial profiles of subgingival plaques in periodontitis. *J Periodontol* 1985;56(8):447-56.
90. Loesche WJ, Giordano JR, Hujoel P, Schwarcz J, Smith BA. Metronidazole in periodontitis: reduced need for surgery. *J Clin Periodontol* 1992;19(2):103-12.
91. McCulloch CA, Birek P, Overall C, Aitken S, Lee W, Kulkarni G. Randomized controlled trial of doxycycline in prevention of recurrent periodontitis in high-risk patients: antimicrobial activity and collagenase inhibition. *J Clin Periodontol* 1990;17(9):616-22.
92. Loesche WJ, Giordano J, Soehren S, Hutchinson R, Rau CF, Walsh L, et al. Nonsurgical treatment of patients with periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1996;81(5):533-43.
93. Lacroix JM, Walker CB. Detection and incidence of the tetracycline resistance determinant tet(M) in the microflora associated with adult periodontitis. *J Periodontol* 1995;66(2):102-8.
94. Lopez NJ, Socransky SS, Da Silva I, Japlit MR, Haffajee AD. Subgingival microbiota of Chilean patients with chronic periodontitis. *J Periodontol* 2004;75(5):717-25.
95. Herrera D, Contreras A, Gamonal J, Oteo A, Jaramillo A, Silva N, et al. Subgingival microbial profiles in chronic periodontitis patients from Chile, Colombia and Spain. *J Clin Periodontol* 2008;35(2):106-13.
96. Socransky SS, Haffajee AD. Implications of periodontal microbiology for the treatment of periodontal infections. *Compend Suppl* 1994(18):S684-5, 88-93; quiz S714-7.
97. Andersson DI. Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr Opin Microbiol* 2003;6(5):452-6.
98. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol*;8(4):260-71.
99. Bidault P, Chandad F, Grenier D. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. *J Can Dent Assoc* 2007;73(8):721-5.
100. Levy SB, Marshall B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nat Med* 2004;10(12 Suppl):S122-9.
101. Goossens H, Ferech M, Vander Stichele R, Elseviers M. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *Lancet* 2005;365(9459):579-87.
102. Courvalin P. Antimicrobial Drug Resistance: "Prediction Is Very Difficult, Especially about the Future". *Emerg Infect Dis* 2005;11(12):1503-06.

103. Feres M, Haffajee AD, Allard K, Som S, Goodson JM, Socransky SS. Antibiotic resistance of subgingival species during and after antibiotic therapy. *J Clin Periodontol* 2002;29(8):724-35.
104. Ainamo J, Talari A. The increase with age of the width of attached gingiva. *J Periodontal Res* 1976;11(4):182-8.
105. Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966;74(5):Suppl:1-380.
106. Vago SC. Intensified form of the mercurochrome-methyl-violet stain for spirochetes. *Stain Technol* 1953;28(2):87-8.
107. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontol* 2000 2004;34:49-56.
108. Slots J. Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescence assay for trypsin-like activity. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2(3):139-41.
109. Alcoforado GA, McKay TL, Slots J. Rapid method for detection of lactose fermenting oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1987;2(1):35-8.
110. Armitage GC. Classifying periodontal diseases--a long-standing dilemma. *Periodontol* 2000 2002;30:9-23.
111. Page RC. Periodontal diseases: a new paradigm. *J Dent Educ* 1998;62(10):812-21.
112. Moore WE. Microbiology of periodontal disease. *J Periodontal Res* 1987;22(5):335-41.
113. Slots J, Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Campylobacter* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J Dent Res* 1984;63(3):412-21.
114. Slots J, Dahlen G. Subgingival microorganisms and bacterial virulence factors in periodontitis. *Scand J Dent Res* 1985;93(2):119-27.
115. Kelstrup J, Theilade E. Microbes and periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1974;1(1):15-35.
116. Socransky SS, Haffajee AD. The nature of periodontal diseases. *Ann Periodontol* 1997;2(1):3-10.
117. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL. Relationship of subgingival microbial complexes to clinical features at the sampled sites. *J Clin Periodontol* 1988;15(7):440-4.
118. Slots J, Rams TE. New views on periodontal microbiota in special patient categories. *J Clin Periodontol* 1991;18(6):411-20.

119. Wolff LF, Aeppli DM, Pihlstrom B, Anderson L, Stoltenberg J, Osborn J, et al. Natural distribution of 5 bacteria associated with periodontal disease. *J Clin Periodontol* 1993;20(10):699-706.
120. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, de Graaff J. The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J Clin Periodontol* 1988;15(3):145-55.
121. Slots J, Moenbo D, Langebaek J, Frandsen A. Microbiota of gingivitis in man. *Scand J Dent Res* 1978;86(3):174-81.
122. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Ann Periodontol* 1996;1(1):879-925.
123. Velazco CH, Coelho C, Salazar F, Contreras A, Slots J, Pacheco JJ. Microbiological features of Papillon-Lefevre syndrome periodontitis. *J Clin Periodontol* 1999;26(9):622-7.
124. Slots J, Contreras A. Herpesviruses: a unifying causative factor in periodontitis? *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(5):277-80.
125. Slots J. Update on human cytomegalovirus in destructive periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(4):217-23.
126. Pacheco JJ, Coelho C, Salazar F, Contreras A, Slots J, Velazco CH. Treatment of Papillon-Lefevre syndrome periodontitis. *J Clin Periodontol* 2002;29(4):370-4.
127. Smith GL. Diagnosis of periodontal disease activity by detection of key microbial antigens. *J Clin Periodontol* 1994;21(9):615-20.
128. Kaldahl WB, Kalkwarf KL, Patil KD, Dyer JK, Bates RE, Jr. Evaluation of four modalities of periodontal therapy. Mean probing depth, probing attachment level and recession changes. *J Periodontol* 1988;59(12):783-93.
129. Magnusson I, Clark WB, Low SB, Maruniak J, Marks RG, Walker CB. Effect of non-surgical periodontal therapy combined with adjunctive antibiotics in subjects with "refractory" periodontal disease. (I). Clinical results. *J Clin Periodontol* 1989;16(10):647-53.
130. van Winkelhoff AJ, Herrera D, Winkel EG, Dellempijn-Kippuw N, Vandembroucke-Grauls CM, Sanz M. [Antibiotic resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparative survey between Spain and the Netherlands]. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 1999;106(8):290-4.
131. Socransky SS, Haffajee AD. Effect of therapy on periodontal infections. *J Periodontol* 1993;64(8 Suppl):754-9.
132. Haffajee AD, Patel M, Socransky SS. Microbiological changes associated with four different periodontal therapies for the treatment of chronic periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23(2):148-57.
133. Haffajee AD, Cugini MA, Dibart S, Smith C, Kent RL, Jr., Socransky SS. The effect of SRP on the clinical and microbiological

- parameters of periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1997;24(5):324-34.
134. Haffajee AD, Arguello EI, Ximenez-Fyvie LA, Socransky SS. Controlling the plaque biofilm. *Int Dent J* 2003;53 Suppl 3:191-9.
135. Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. *Ann Periodontol* 1996;1(1):37-215.
136. Armitage GC. Diagnostic tests for periodontal diseases. *Curr Opin Dent* 1992;2:53-62.
137. Beikler T, Prior K, Ehmke B, Flemmig TF. Specific antibiotics in the treatment of periodontitis--a proposed strategy. *J Periodontol* 2004;75(1):169-75.
138. Tanner A, Maiden MF, Macuch PJ, Murray LL, Kent RL, Jr. Microbiota of health, gingivitis, and initial periodontitis. *J Clin Periodontol* 1998;25(2):85-98.
139. Kuriyama T, Williams DW, Yanagisawa M, Iwahara K, Shimizu C, Nakagawa K, et al. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(4):285-8.
140. Sedlacek MJ, Walker C. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(5):333-9.
141. Feres M. Antibiotics in the treatment of periodontal diseases: microbiological basis and clinical applications. *Ann R Australas Coll Dent Surg* 2008;19:37-44.
142. Walker C, Karpinia K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2002;73(10):1188-96.
143. Tomas I, Tomas M, Alvarez M, Velasco D, Potel C, Limeres J, et al. Susceptibility of oral obligate anaerobes to telithromycin, moxifloxacin and a number of commonly used antibacterials. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(5):298-303.
144. Milazzo I, Blandino G, Musumeci R, Nicoletti G, Lo Bue AM, Speciale A. Antibacterial activity of moxifloxacin against periodontal anaerobic pathogens involved in systemic infections. *Int J Antimicrob Agents* 2002;20(6):451-6.
145. Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineill JL, Sixou M. Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20(4):244-52.
146. Koeth LM, Good CE, Appelbaum PC, Goldstein EJ, Rodloff AC, Claros M, et al. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2004;53(6):1039-44.

147. Mosca A, Miragliotta L, Iodice MA, Abbinante A, Miragliotta G. Antimicrobial profiles of *Prevotella* spp. and *Fusobacterium nucleatum* isolated from periodontal infections in a selected area of southern Italy. *Int J Antimicrob Agents* 2007;30(6):521-4.
148. King A, Downes J, Nord CE, Phillips I. Antimicrobial susceptibility of non-*Bacteroides fragilis* group anaerobic Gram-negative bacilli in Europe. *Clin Microbiol Infect* 1999;5(7):404-16.
149. van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005;32(8):893-8.
150. Sobottka I, Cachovan G, Sturenburg E, Ahlers MO, Laufs R, Platzer U, et al. In vitro activity of moxifloxacin against bacteria isolated from odontogenic abscesses. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(12):4019-21.
151. Jaramillo A, Arce RM, Herrera D, Betancourth M, Botero JE, Contreras A. Clinical and microbiological characterization of periodontal abscesses. *J Clin Periodontol* 2005;32(12):1213-8.
152. Luong N, Tsai J, Chen C. Susceptibilities of *Eikenella corrodens*, *Prevotella intermedia*, and *Prevotella nigrescens* clinical isolates to amoxicillin and tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(11):3253-5.
153. Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA. Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiol Lett* 2005;242(2):319-24.
154. Kulik EM, Lenkeit K, Chenuaux S, Meyer J. Antimicrobial susceptibility of periodontopathogenic bacteria. *J Antimicrob Chemother* 2008;61(5):1087-91.
155. Muller HP, Holderrieth S, Burkhardt U, Hoffler U. In vitro antimicrobial susceptibility of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to seven antibiotics. *J Clin Periodontol* 2002;29(8):736-42.
156. Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Amoxicillin plus metronidazole in the treatment of adult periodontitis patients. A double-blind placebo-controlled study. *J Clin Periodontol* 2001;28(4):296-305.
157. van Winkelhoff AJ, Herrera Gonzales D, Winkel EG, DelleMijn-Kippuw N, Vandenbroucke-Grauls CM, Sanz M. Antimicrobial resistance in the subgingival microflora in patients with adult periodontitis. A comparison between The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2000;27(2):79-86.

158. Filippini M, Masiero G, Moschetti K. Socioeconomic determinants of regional differences in outpatient antibiotic consumption: evidence from Switzerland. *Health Policy* 2006;78(1):77-92.

ANEXOS

FICHA CLÍNICO- MICROBIOLÓGICA

Identificação do Paciente:

Data de colheita:

Locais de colheita:	
Profundidade das bolsas:	Perda de aderência:
Tratamento:	
Hábitos tabágicos:	
Diagnóstico clínico:	

Microrganismos isolados	Data de Leitura	UFC/ml	% em relação à Flora Total
<i>A. actinomycetemcomitans</i>			
<i>Capnocytophaga spp.</i>			
<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>			
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			
<i>Eikenella corrodens</i>			
<i>Fusobacterium spp.</i>			
<i>Eubacterium</i>			
<i>Peptostreptococcus spp</i>			
<i>Campylobacter spp.</i>			
<i>Streptococcus β-hemolíticos</i>			
<i>Staphylococcus spp.</i>			
Bacilos Gram negativos entéricos e não entéricos			
Leveduras			
Espiroquetas *			

*Avaliação microscópica: + 1/ campo; ++ 2 – 3/ campo; +++ > 4/campo

CONSENTIMENTO INFORMADO PARA PESQUISA EM PACIENTES

Por favor leia atentamente este texto e pergunte se tiver alguma dúvida ou necessitar de mais informação.

CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Título da investigação:

Nome do investigador: José Lopes

Eu, _____,
morador na rua _____,
Cp. _____ dou meu consentimento, consciente e de livre vontade para participar na
investigação acima referida.

Eu compreendo que esta investigação é realizada com o propósito de aumentar o
conhecimento médico.

Eu compreendo que posso retirar o meu consentimento a qualquer altura da
investigação.

Eu comprometo-me a informar o investigador de qualquer doença que padeço ou
qualquer tratamento médico que estou a efectuar.

Eu compreendo o propósito da investigação e a minha investigação nesta, que me foi
explicada detalhadamente pela Dr. José Lopes.

Data

Assinatura

DECLARAÇÃO DO INVESTIGADOR

Confirmo que informei o paciente acima identificado da natureza da investigação e dos
seus procedimentos e que este acedeu a participar de livre vontade.

Dr. José Lopes

