



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**  
**Faculdade de Odontologia**

**Laís Christina Pontes Espíndola**

**PREVALÊNCIA, SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E VIRULÊNCIA  
DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS E ENTEROCOCOS ISOLADOS DO  
BIOFILME SUBGENGIVAL ASSOCIADO À DOENÇA PERIODONTAL**

**Rio de Janeiro**

**2020**

**Laís Christina Pontes Espíndola**

**“Prevalência, susceptibilidade antimicrobiana e virulência de bacilos Gram-negativos e enterococos isolados do biofilme subgengival associado à doença periodontal”**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Odontologia (Periodontia).

**Orientadores: Profa. Dra. Ana Paula V. Colombo**

**Profa. Dra. Renata Martins do Souto**

**Rio de Janeiro**

**2020**

## FICHA CATALOGRÁFICA

### CIP - Catalogação na Publicação

PE77p Pontes Espindola, Lais Christina  
Prevalência, susceptibilidade antimicrobiana e virulência de bacilos Gram-negativos e enterococos isolados do biofilme subgingival associado à doença periodontal / Lais Christina Pontes Espindola. -- Rio de Janeiro, 2020.  
137 f.

Orientadora: Ana Paula Vieira Colombo.  
Coorientadora: Renata Martins do Souto.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2020.

1. Doença periodontal. 2. Microbiota subgingival.  
3. Bacilos Gram-negativos. 4. Enterococcus spp. 5. Resistência antimicrobiana. I. Vieira Colombo, Ana Paula, orient. II. Martins do Souto, Renata, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Laís Christina Pontes Espíndola**

**Prevalência, susceptibilidade antimicrobiana e virulência de bacilos Gram-negativos e enterococos isolados do biofilme subgengival associado à doença periodontal**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia), Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor em Odontologia (Periodontia).

Aprovada em \_\_\_\_\_

---

Ana Paula Vieira Colombo, Profa. Titular do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), UFRJ

---

Anna Thereza Thomé Leão, Profa. Titular do Departamento de Clínica Odontológica, UFRJ

---

Ana Luiza de Mattos Guaraldi, Profa. Associada da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ

---

Sérgio Eduardo Longo Fracalanza, Prof. Titular do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (IMPG), UFRJ

---

Simone Aranha Nouer, Profa. Associada da Faculdade de Medicina, UFRJ

*Dedico esse trabalho aos meus amados pais, meu porto seguro, Luiz Marinho e Socorro Espíndola. A distância se fez presente ao longo desses 6 anos vivendo distante de casa, entretanto o apoio, ajuda e amor de vocês foram essenciais para eu concretizar essa conquista.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte de força e esperança.

Aos meus queridos pais, Luiz e Socorro, exemplos de pessoas, pelos ensinamentos, pelos valores que me ensinaram a cultivar, pelo caminho que me orientaram a seguir, por estarem sempre ao meu lado e simplesmente pelo amor incondicional que sempre me dedicaram. Não sei como agradecer pela família maravilhosa, pela educação e por tudo que vocês me proporcionaram.

Ao meu irmão Diego e ao meu afilhado Cauã, pelo apoio, ajuda e amor.

Ao Henrique, por ser tão paciente e me dar amor e motivação, acreditando mais em mim que eu mesma.

A minha tia Socorro Espíndola pelo convívio diário e apoio ao longo desses seis anos, por ser minha família aqui no Rio de Janeiro.

As minhas tias pela força, carinho e estímulo de sempre.

A minha professora orientadora, Dra.<sup>a</sup> Ana Paula Colombo, pelos seus ensinamentos, dedicação, paciência, confiança e amizade para comigo. Sem dúvida, foi um privilégio aprender com uma pessoa tão sábia. Serei sempre grata por auxiliar no meu crescimento profissional. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna.

A minha professora e orientadora, Dr.<sup>a</sup> Renata Martins do Souto, por todas os ensinamentos, atenção, empenho e dedicação. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna e aprendi muito com você. Sempre muito atenciosa e disposta a ajudar.

Às companheiras de laboratório, Dr.<sup>a</sup> Talita Lourenço, Dr.<sup>a</sup> Raquel Miranda, Dr.<sup>a</sup> Fátima Aparecida, Mestre Adriana Miranda, Lélia Araújo, pela convivência harmoniosa, auxílio na ajuda do trabalho e amizade, a rotina foi muito melhor por terem vocês.

Ao meu aluno de iniciação científica, Marcos Vinícius, pela ajuda na coleta dos dados da minha pesquisa.

À aluna de pós-graduação Stella Mançano e à Professora Renata Cristina Picão por toda disponibilidade e colaboração na pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia): Prof.<sup>a</sup> Anna Thereza Leão, Prof.<sup>a</sup> Maria Cynésia Torres, Prof. Eduardo Feres, Prof. Carmelo Sansone, agradeço por todo o apoio e ensinamento durante o curso.

Aos amigos de turma da pós-graduação em Periodontia, pessoas que tive oportunidade de conhecer e conviver, sempre tão presentes, pela amizade e carinho.

Aos pacientes, que tornaram o estudo possível.

As minhas grandes amigas Gabriela Monteiro, Larissa de Almeida, Laura Teresa, Mariana Reys, Olga Oliveira por toda ajuda, amor, carinho e amizade, nos bons e maus momentos, desde a infância.

As minhas amigas de graduação, Thaciane Rocha, Camila Ximenes, Priscila Correia, Ayla Macyelle e Marília Tenório, pelo apoio, amizade, ajuda e estímulo em seguir esta jornada.

As minhas amigas Fernanda Mainoth, Suzan Alves, Mariah Paulino, Udson Bandeira, Ariana Sereno, que fazem da minha vida no Rio de Janeiro mais leve, pela amizade e companheirismo.

Aos órgãos de Fomento: CNPq, FAPERJ e CAPES pelo apoio financeiro durante meu período de formação.

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho e concretização desse sonho, meus sinceros agradecimentos.

“Nunca permita que alguém corte suas asas, estreite seus horizontes e tire as estrelas do teu céu. Nunca deixe que teu medo seja maior que a tua vontade de voar. O valor da vida está nos sonhos que lutamos para conquistar.”

*Charles Edward*



## RESUMO

ESPÍNDOLA, Laís Christina Pontes. Prevalência, susceptibilidade antimicrobiana e virulência de bacilos Gram-negativos e enterococos isolados do biofilme subgingival associado à doença periodontal. Rio de Janeiro, 2020. Tese (Doutorado em Odontologia – Periodontia). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

**Objetivos:** A cavidade oral pode atuar como reservatório de vários patógenos de importância clínica, incluindo bacilos Gram-negativos (BGN) e *Enterococcus* spp. Essas espécies podem ainda aumentar em uma condição disbiótica, como ocorre nas doenças periodontais. Assim, este estudo teve como objetivo determinar a prevalência, susceptibilidade antimicrobiana e presença de fatores de virulência de BGN e enterococos isolados do biofilme subgingival de indivíduos com diferentes condições periodontais, correlacionando esses achados com parâmetros clínicos e composição da microbiota subgingival. **Métodos:** Na análise dos BGN, amostras de biofilme subgingival foram obtidas de indivíduos com Saúde Periodontal (SP, n=81), Gengivite (G, n=74) e Periodontite (P, n=207); para *Enterococcus* spp., amostras foram coletadas de 139 indivíduos com SP, 103 com G e 305 com P. As amostras foram cultivadas em meio seletivo e as colônias isoladas e identificadas por MALDI-ToF. A susceptibilidade antimicrobiana foi determinada por disco-difusão (CLSI); já os genes de virulência de enterococos e genes codificadores de ESBL e carbapenemases em BGN foram pesquisados por PCR. A produção de ESBL e carbapenemases por BGN foi avaliada pelo teste de sinergia de disco duplo e hidrólise de imipenem por espectrofotometria, respectivamente. A microbiota subgingival desses indivíduos foi determinada pelo *Checkerboard*. Diferenças entre os grupos foram avaliadas pelos testes de Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Qui-quadrado. **Resultados:** BGN foram isolados em 36.2% das amostras, com maior prevalência ( $p < 0,001$ ) em pacientes com P (46.4%) em comparação com SP (22.2%) e G (22.9%). *Pseudomonas aeruginosa* (27.5%), *Enterobacter cloacae* (16.8%) e *Enterobacter asburiae* (10.7%) foram as espécies mais predominantes. Resistência/sensibilidade reduzida  $a \geq 1$  antimicrobiano foi encontrada em 60% dos BGN, mas apenas 4.6% eram multirresistentes. Altas taxas de resistência ( $>40\%$ ) foram observadas na família *Enterobacteriaceae* para cefoxitina, cefalotina, amoxicilina-

clavulanato e cefazolina. Uma única cepa de *K. pneumoniae* apresentou resistência/sensibilidade reduzida ao imipenem, embora o fenótipo ESBL e a detecção dos genes codificadores de beta-lactamases foram negativos. *Enterococcus* spp. foram isolados em 7.4% de todas as amostras, 53.7% eram *E. faecalis*. Essas espécies foram mais predominantes na P (9.8%) e G (7.8%) do que na SP (2.2%,  $p < 0,05$ ); entretanto não houve correlação com os níveis de gravidade da P. Altas taxas de resistência/susceptibilidade reduzida foram observadas para ciprofloxacina, eritromicina e rifampicina. Os fatores de virulência mais predominantes incluíram *ace*, *asa* e *esp*, todos relacionados à formação de biofilme e colonização. *F. nucleatum* foi mais prevalente na microbiota de indivíduos enterococos +. Por outro lado, *Dialister pneumosintes* foi pouco detectado em indivíduos portadores de enterococos *bopD*+. Estreptococos orais foram prevalentes (>70%) na microbiota de pacientes que apresentavam enterococos susceptíveis à doxiciclina ( $p < 0,05$ ), frequentemente *bopD*- e *esp*- ( $p < 0,01$ ). **Conclusão:** Uma prevalência elevada de BGN da família *Enterobacteriaceae* com resistência a cefalosporinas e penicilina é observada na microbiota subgengival de indivíduos com P. *Enterococcus* spp., principalmente *E. faecalis* são pouco frequentes na microbiota subgengival associada à SP, porém aumentam significativamente nas doenças periodontais. Os mesmos apresentam diversos genes de virulência compatíveis com destruição tecidual, bem como resistência a antimicrobianos de uso na clínica periodontal, o que pode limitar uma resposta terapêutica favorável.

**Palavras-chave:** Doença periodontal; Microbiota subgengival; Bacilos Gram-negativos; *Enterococcus* spp.; Resistência antimicrobiana; Fatores de virulência.

## ABSTRACT

ESPÍNDOLA, Laís Christina Pontes. Prevalência, susceptibilidade antimicrobiana e virulência de bacilos Gram-negativos e enterococos isolados do biofilme subgingival associado à doença periodontal. Rio de Janeiro, 2020. Tese (Doutorado em Odontologia – Periodontia). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

**Background/Aim:** The oral cavity can act as a reservoir for several pathogens of clinic importance, including Gram-negative bacilli (GNB) and *Enterococcus* spp. These species may increase even more in a dysbiotic condition as seen in periodontal diseases. Thus, this study aimed to determine the prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence factors of GNB and enterococci isolated from subgingival biofilm of individuals with different periodontal conditions, correlating these findings with clinical parameters and the composition of the subgingival microbiot. **Methods:** For GNB analysis, subgingival biofilm was obtained from individuals with periodontal health (PH, n=81), gingivitis (G, n=74) and periodontitis (P, n=207), whereas for enterococci isolation samples were taken from 139 patients with PH, 103 with G, and 305 with P. Samples were cultivated in selective media and isolated colonies were identified by MALDI-ToF. Antimicrobial susceptibility was determined by CLSI disk diffusion, whereas virulence genes by PCR. Production of ESBL and carbapenemases were evaluated by double disk synergy test and spectrophotometric detection of imipenem hydrolysis, respectively, and ESBL and carbapenemase encoding genes were surveyed by PCR. The subgingival microbiota was determined by checkerboard. Differences among groups were examined by Chi-square, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests. **Results:** GNB were isolated from 36.2% of all samples, with a significantly greater prevalence ( $p < 0.001$ ) in P patients (46.4%) compared to PH (22.2%) and G (22.9%). *Pseudomonas aeruginosa* (27.5%), *Enterobacter cloacae* (16.8%) and *Enterobacter asburiae* (10.7%) were the most predominant species. Resistance/reduced sensitivity to  $\geq 1$  antimicrobial was found in 60% of GNB, but only 4.6% were multidrug resistant. High resistance rates ( $>40\%$ ) were seen in the *Enterobacteriaceae* family for ceftiofur, ceftazidime, amoxicillin-clavulanate, and cefazolin. One strain of *K. pneumoniae* showed resistance/reduced sensitivity to imipenem, although the ESBL-phenotype and PCR targeting beta-lactamase encoding

genes were negative. *Enterococcus* spp. were isolated from 7.4% of all samples; 53.7% were *E. faecalis*. Enterococci were more predominant in P (9.8%) and G (7.8%) samples than PH (2.2%;  $p < 0.05$ ), however there were no associations with distinct levels of disease severity. High rates of low susceptibility/resistance were seen for ciprofloxacin, erythromycin and rifampicin. Predominant virulence factors included *ace*, *asa* and *esp*, all related to colonization and biofilm formation. *F. nucleatum* was prevalent in the microbiota of enterococci+ individuals. In contrast, lower frequency of *Dialister pneumosintes* was found in patients carrying *bopD*+ enterococci. Oral streptococci were prevalent (>70%) in the microbiota of patients carrying enterococci susceptible to doxycycline ( $p < 0.05$ ), which were also frequently *bopD*- and *esp*- ( $p < 0.01$ ). **Conclusion:** A high prevalence of GNB of the *Enterobacteriaceae* family, resistant to cephalosporins and penicillins is observed in the subgingival microbiota of patients with P, *Enterococcus* spp., mainly *E. faecalis* are not commonly detected in the healthy-related subgingival microbiota, however their frequency increases significantly in patients with periodontal diseases. These species carry several genes related to tissue destruction, as well as resistance to antimicrobials routinely used in the periodontal clinic, which may hinder a successful therapeutic response.

**Keywords:** Periodontal disease; Subgingival microbiota; Gram-negative bacilli; *Enterococcus* spp.; Antimicrobials resistance; Virulence factors.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- Aa - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- ace- Adesinas ao colágeno
- asa- Substância de agregação
- ATCC – *American Type Culture Collection*
- BD – Biofilme dentário
- BHI - *Brain heart infusion*
- BGN- Bacilo Gram-negativo
- BGNNF – Bacilo Gram-negativo não fermentador
- bop- Formação de biofilme
- CA- Índice de cálculo dentário
- CLSI- *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- cyl- Citolisina
- DMSO- Dimetilsulfóxido
- DNA – *Deoxyribonucleic Acid*
- DP- Doença Periodontal
- EDTA – *Ethylenediamine Tetraacetic acid*
- efa- Antígeno da endocardite
- ESBL – Beta-lactamase de espectro estendido
- esp- Proteína de superfície
- FAO- Organização das Nações Unidas para alimentação e agricultura
- G- Gengivite
- gel – Gelatinase
- IG – Índice gengival
- IP – Índice de placa
- KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
- LPS - Lipopolissacarídeo
- MALDI-TOF - Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser assistida por Matriz
- MBLs- Metalo beta-lactamases
- NCI – Nível clínico de inserção
- OIE- Organização Mundial da Saúde Animal
- OMS- Organização Mundial da Saúde

OXA- Oxacilinase

P- Periodontite

PCR – *Polymerase chain reaction*

PS – Profundidade de sondagem

SS- Sangramento à sondagem

*sprE*- Endopeptidase de serina

SP- Saúde Periodontal

SUP- Índice de supuração

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TBE- Tampão tris-borato-EDTA

TE – Tampão tris-EDTA

TSA - *Trypticase Soy Agar*

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELA

<b>Figura 1.</b> Fotografia e radiografia interproximal de paciente com gengivite.....	2
<b>Figura 2.</b> Fotografias e radiografia de paciente com periodontite.....	3
<b>Figura 3.</b> Complexos microbianos no biofilme subgengival. Fonte: SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002.....	4
<b>Figura 4.</b> Diferenciação de bacilos Gram-negativos em meio seletivo Mac Conkey.....	8
<b>Figura 5.</b> Identificação e caracterização fenotípica de <i>Enterococcus</i> spp. ....	23
<b>Figura 6.</b> Identificação e caracterização fenotípica de bacilos Gram-negativos.....	23
<b>Figura 7.</b> Antibiograma pela técnica de disco-difusão de uma cepa de <i>E. faecalis</i> .....	25
<b>Figura 8.</b> Antibiograma. a) Semeadura de cepa de <i>Enterobacteriaceae</i> utilizando um inóculo de 0,5 da escala de Mcfarland sobre meio Muller-Hinton. b) Deposição dos discos de antimicrobianos sobre a placa semeada. c) Halos de inibição de crescimento de <i>Serratia marcescens</i> após 18 h de incubação. d) Halos de inibição de crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> após 18 h de incubação. ....	27
<b>Tabela 1.</b> Principais fatores de virulência e sua possível associação com o estágio de infecção por <i>Enterococcus</i> spp.....	12

## SUMÁRIO

RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELA.....	xv
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Doença Periodontal- Definição.....	1
1.2. Etiologia Microbiana- Biofilme.....	3
1.3. Cavidade bucal como reservatório de bactérias de importância médica.....	6
1.4. Bacilos Gram-negativos.....	6
1.5. Enterococos.....	9
1.5.1. Fatores de Virulência dos Enterococos.....	10
1.6. Resistência Antimicrobiana.....	12
2. JUSTIFICATIVA.....	16
3. PROPOSIÇÃO.....	17
4. METODOLOGIA.....	18
4.1 Amostra Populacional.....	18
4.2 Exame Clínico Periodontal.....	19
4.3 Reprodutibilidade Intra-Examinador.....	19
4.4 Coleta de Amostras para Análise Microbiológica.....	19
4.5 Análise Microbiológica através da técnica de Checkerboard DNA-DNA hybridization.....	20
4.6 Identificação e caracterização fenotípica de <i>Enterococcus</i> spp. e Bacilos Gram-negativos.....	22
4.6.2 Confirmação de identificação através da Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF).....	23
4.7 Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos dos Isolados de <i>Enterococcus</i> spp.....	24
4.8 Identificação Genotípica dos Fatores de Virulência das Espécies de <i>Enterococcus</i> spp.....	25
4.9 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos dos Bacilos Gram-negativos.....	25
4.9.1 Detecção de Cepas com Redução da Sensibilidade ou Resistência aos Carbapenemas para BGN.....	27



4.9.2. Detecção Fenotípica de ESBL.....	28
4.9.3. Detecção genotípica para Carbapenemases e ESBL.....	28
4.10. Análise de Dados.....	28
5.MANUSCRITO I.....	30
6. MANUSCRITO II.....	57
7. DISCUSSÃO.....	88
8. CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
ANEXO I.....	113
ANEXO II.....	115
ANEXO III.....	116
ANEXO IV.....	117
ANEXO V.....	120

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Doença Periodontal –Definição:

A doença periodontal (DP) é definida como uma infecção de natureza polimicrobiana multifatorial, que resulta em um processo inflamatório crônico o qual afeta os tecidos de proteção e sustentação dos dentes de indivíduos susceptíveis, o que pode resultar na perda do elemento dentário (Page *et al.*, 1997). A mesma tem início quando o equilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro é quebrado e atualmente, novos modelos de etiopatogênese tem sido propostos. No modelo conhecido como Sinergismo e Disbiose Polimicrobiana ou *Polymicrobial Synergy and Dysbiosis* (PSD), após o estabelecimento de uma microbiota clímax, o crescimento desordenado de algumas bactérias patogênicas, conhecidas como patobiontes, pode provocar um desequilíbrio no microambiente periodontal devido à produção de fatores de virulência que induzem inflamação e destruição dos tecidos periodontais. Com um novo ambiente patogênico e uma susceptibilidade do hospedeiro causada por uma alteração da resposta imunológica do hospedeiro, a disbiose se estabelece (Page *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2007, Hajishengallis & Lamont, 2012; Laine *et al.*, 2012; Teles *et al.*, 2013; Lamont & Hajishengallis, 2015; Kinane *et al.*, 2017). O fumo, por exemplo, é categorizado como o mais importante fator de risco para o desenvolvimento e progressão da DP (Akl *et al.*, 2007).

A DP é uma das doenças inflamatórias crônicas humanas mais frequentes na população mundial e estima-se que entre 30-50% dos adultos com 30 anos ou mais de idade sejam acometidos por esta doença. (Albandar, 2002; Baelum & Scheutz, 2002; Sheiham & Netuveli, 2002; Dye, 2012). A mesma corresponde à segunda maior causa de perda dentária no mundo (Petersen & Ogawa, 2005), assim como no Brasil, sendo a mais prevalente depois da cárie dentária (MS, 2011) e corresponde a segunda doença bucal de maior prevalência em humanos, já que 70% da população mundial apresenta um ou mais danos nos tecidos periodontais que incluem: gengiva, ligamento periodontal e osso alveolar (Oppermann *et al.*, 2015).

Clinicamente, as DPs podem ser agrupadas em duas entidades distintas, as gengivites e periodontites conforme estabelecido pela nova classificação de doença periodontal proposta no *2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-implant Diseases and Conditions* (Caton *et al.*, 2018). A gengivite caracteriza-se como uma inflamação superficial da gengiva, reversível, na qual o epitélio encontra-se íntegro, sem haver perda de inserção, apesar das alterações patológicas, com sinais clínicos de sangramento e edema (Figura 1).

Sendo uma condição reversível e sem maiores consequências para o hospedeiro quando um adequado controle do biofilme dental é instituído (Newman *et al.*, 1994; Kinane *et al.*, 2017). Já a periodontite é uma doença resultante de uma disbiose significativa da microbiota subgingival, que ocasiona um quadro inflamatório crônico com destruição do tecido periodontal de suporte (Figura 2). Existe um acúmulo de placa nos tecidos mais profundos, causando uma perda de inserção por destruição do tecido conjuntivo e por reabsorção do osso (Hajishengallis & Lamont, 2012; Bartold & Van Dyke, 2013; Kinane *et al.*, 2017). As periodontites podem ter diferentes níveis de gravidade e extensão. Em relação à gravidade e complexidade de manejo do paciente, podem ser categorizadas em Estágio I (periodontite inicial), Estágio II (periodontite moderada), Estágio III (periodontite avançada com potencial para perda dentária) e Estágio IV (periodontite avançada com potencial para a perda da dentição). Em relação à extensão podem ser localizadas (quando envolvem menos de 30% dos sítios periodontais), generalizadas (> 30% dos sítios), com ou sem envolvimento de molares e incisivos. E finalmente, em relação à progressão e resposta terapêutica, podem ser graduadas em grau A (perda de progressão lenta), grau B (perda de progressão moderada) e grau C (perda de progressão avançada) (Caton *et al.*, 2018). As DPs são de difícil classificação, especialmente a periodontite, devido à grande variabilidade na apresentação clínica, assim como em sua extensão e gravidade em todas as faixas etárias. Com tudo isso, o diagnóstico da doença ainda permanece sendo clínico (Papapanou *et al.*, 2018).



**Figura 1.** Fotografia e radiografia de paciente com gengivite. Observa-se placa dental supragengival na maioria dos dentes, bem como edema e inflamação gengival. Na radiografia interproximal pode-se notar um epitélio íntegro, sem perda óssea alveolar.



**Figura 2.** Fotografias e radiografia de pacientes com periodontite crônica. Pode-se notar grandes quantidades de cálculo e placa dental supra e subgingivais na maioria dos dentes, bem como edema e inflamação gengival. A radiografia mostra a perda óssea alveolar generalizada e presença de cálculo subgingival.

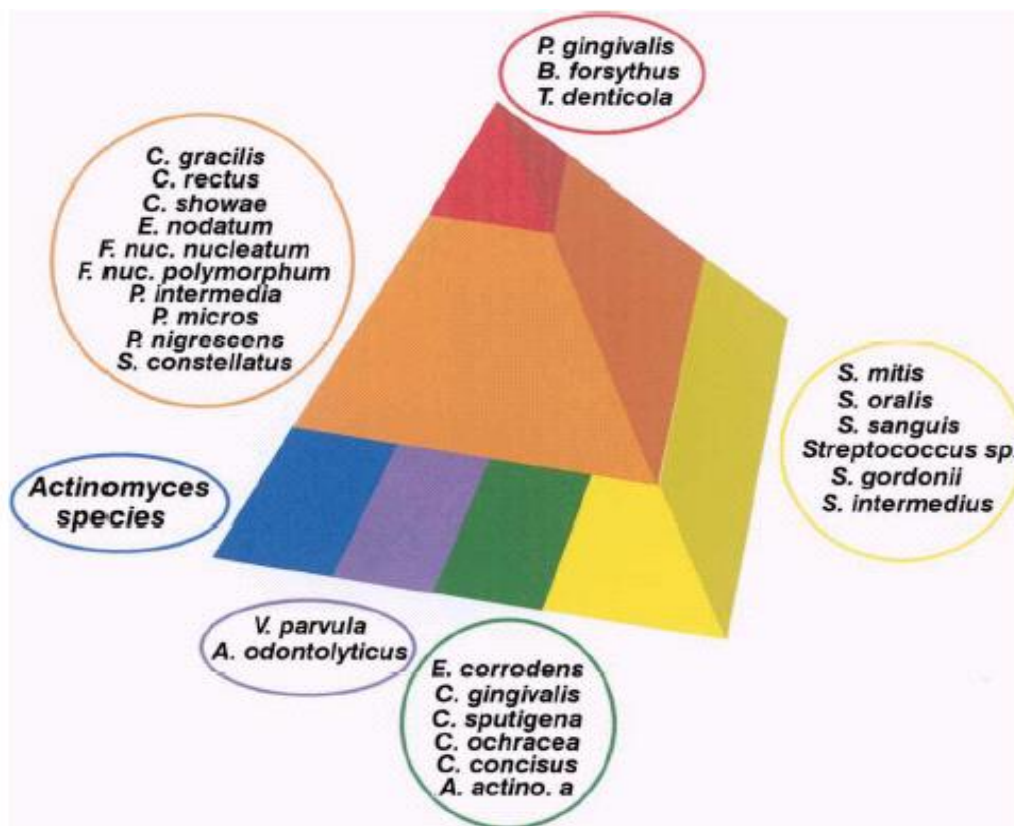
## 1.2 Etiologia microbiana - Biofilme Periodontal

O fator etiológico primário das doenças periodontais é a presença e persistência de um biofilme supra/subgingival periodontopatogênico (Socransky & Haffajee, 1992; Socransky, 1994; Socransky & Haffajee, 2002). Logo, a caracterização da microbiota periodontal é muito importante para o diagnóstico dessas doenças. Mais de 700 espécies ou filotipos já foram identificadas na cavidade oral, sendo que 400 dessas espécies colonizam a bolsa periodontal e cerca de 50% ainda são consideradas não cultiváveis (Paster *et al.*, 2001, 2006; Paster & Dewhirst, 2009; Dewhirst *et al.*, 2010). Esses microrganismos colonizam predominantemente diferentes nichos na cavidade oral, como mucosas, dorso da língua e o biofilme dentário (BD) supra e subgingival (Mager *et al.* 2003).

O BD corresponde a uma comunidade microbiana espacialmente organizada, aderida à superfície dentária e inserida em uma matriz extracelular glicoprotéica (Costerton *et al.*, 1999). Microrganismos são capazes de aderir a superfícies, multiplicar-se e co-agregar-se, sendo este um mecanismo primordial para o crescimento e sobrevivência de muitas espécies distintas. A capacidade de um microrganismo de formar biofilme é considerada um fator de virulência, pois

confere maior resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro, ao estabelecimento de microrganismos competidores exógenos, a presença de substâncias potencialmente nocivas (antimicrobianos) e à ação mecânica, proporcionando maior chance de sobrevivência no hospedeiro.

Complexas e específicas associações entre as diferentes bactérias que constituem o BD têm sido demonstradas em diferentes estudos de ecologia oral (Rams *et al.*, 1997; Socransky & Haffajee, 2002; Kolembrander, 2010). Em 1998, Socransky e colaboradores descreveram que algumas espécies bacterianas orais do biofilme subgengival estavam intimamente relacionadas entre si e agrupavam-se em complexos, e que essas associações dentro desses complexos eram organizadas de forma hierárquica (Figura 3). Esses autores também demonstraram que os complexos apresentavam uma correlação espacial entre si (Socransky *et al.*, 1988). Por exemplo, os complexos azul, roxo, amarelo e verde correspondem aos microrganismos comensais frequentemente encontrados em todos os sítios periodontais e indivíduos, condizentes com saúde oral. Já os complexos laranja e vermelho compreendem espécies patogênicas, predominante em sítios periodontais e/ou indivíduos portadores de DP (Socransky & Haffajee, 2002).



**Figura 3.** Complexos microbianos no biofilme subgengival. Fonte: SOCRANSKY & HAFFAJEE, 2002.

Alterações significativas na composição e função do BD ocorrem durante a transição de um estado de saúde para gengivite, e posteriormente DP (Chapple *et al.* 2018). Na presença da saúde periodontal, há o predomínio de estreptococos orais e espécies de *Actinomyces*, os quais são microrganismos Gram-positivos de baixo potencial patogênico, normalmente considerados colonizadores primários do biofilme periodontal, que possuem um papel benéfico contra a colonização de espécies mais patogênicas (Slots, 1979; Haffajee *et al.*, 2009). A presença dessa microbiota normal residente é capaz de inibir a colonização de patógenos (Vollaard & Clasener, 1994), visto que ocupam os sítios de ligações potencialmente utilizados para adesão pelas espécies patogênicas (Wade, 2013). A importância deste efeito pode ser vista quando a microbiota comensal é interrompida, por exemplo, através do uso de antimicrobianos (Sullivan *et al.*, 2001). Outro exemplo é a ausência de um controle adequado do BD que resulta na modificação do microambiente periodontal (inflamação gengival) e favorece o aumento da complexidade e patogenicidade deste biofilme. Nesta condição de gengivite, há um aumento de bactérias Gram-negativas anaeróbicas (principalmente espécies do complexo laranja), com conseqüente liberação de endotoxinas e outras enzimas que ocasionam a inflamação e irritação gengival, ativando as vias pró-inflamatórias, embora várias bactérias facultativas Gram-positivas e Gram-negativas também possam contribuir para a destruição periodontal (Armitage, 2010; Beikler & Flemmig, 2011). A doença é totalmente reversível se a higiene oral for reintegrada (Loe *et al.*, 1965), sendo a quantidade de placa bacteriana presente, sua carga e maturidade correlacionados com a gravidade da doença (Socransky, 1977).

Por mecanismos não totalmente compreendidos, a gengivite não tratada pode progredir para os tecidos de suporte dos dentes, o que acarreta na periodontite em determinados indivíduos susceptíveis, como um resultado da disbiose entre esse biofilme e o sistema imune do hospedeiro (Slots & Rams, 1991; Socransky & Haffajee, 1992; Wolff *et al.*, 1994). Na periodontite, os microrganismos predominantes incluem os membros dos complexos laranja e vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*), bem como o patógeno *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, sendo o clone JP2 altamente leucotóxico associado às formas mais agressivas da DP (Kilian *et al.*, 2006; Armitage, 2010; Henderson *et al.*, 2010). Na última década, novas espécies orais com potencial patogênico têm sido relatadas e relacionadas as DPs (Kumar *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2005; Ferraro *et al.*, 2007; Wilson Aruni *et al.*, 2015).

### 1.3 Cavidade bucal como reservatório de bactérias de importância médica

Tem sido crescente o interesse na busca de espécies oportunistas na cavidade oral, pois microrganismos que crescem em biofilme, como o biofilme dental, tendem a ser menos susceptíveis à ação dos antimicrobianos e ao sistema imune, o que pode levar a sérias implicações clínicas, como a criação de um foco de infecção, re-infecção e insucesso terapêutico (Smith *et al.*, 2001). Com o desenvolvimento de métodos moleculares para a detecção de microrganismos em diversos *habitats* do organismo humano, observou-se que a diversidade da microbiota oral é significativamente maior do que anteriormente estabelecido por métodos tradicionais de cultivo microbiano (Paster *et al.*, 2001; 2006). Espécies microbianas normalmente associadas a infecções em outras partes do organismo humano, bem como espécies ambientais tem sido descritas em proporções e níveis elevados na DP (Rams *et al.*, 1990; 1992; Colombo *et al.*, 2005; 2009; 2012; Ferraro *et al.*, 2007; Souto & Colombo, 2008a; 2008b; Fritschi *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009; Heller *et al.*, 2011; 2012; Artese *et al.*, 2012; Silva-Senem *et al.*, 2013; Silva-Boghossian *et al.*, 2011; 2014, Souto *et al.*, 2014). Dentre essas espécies, podemos destacar *Enterococcus faecalis*, *Dialister pneumosintes*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Parvimonas micra*, *Streptococcus anginosus*, *Sacharabacteria* TM7 spp. Apesar do aumento significativo dessas espécies no BD e saliva de indivíduos com periodontite e gengivite em comparação a indivíduos com saúde periodontal, o papel desses microrganismos na etiopatogenia das DPs ainda é desconhecido.

Num BD associado à doença, é de se esperar que ocorram relações complexas e diversas entre espécies periodontais conhecidas e microrganismos não orais ou ainda desconhecidos, bem como entre essa microbiota e o hospedeiro que poderão ser melhor elucidadas com a finalidade de proporcionar um melhor diagnóstico e tratamento das infecções periodontais (Brook, 1988; Andersen *et al.*, 1998; Kolembrander *et al.*, 2006; Teles *et al.*, 2013).

### 1.4 Bacilos Gram-Negativos

Microrganismos Gram-negativos tem como característica principal a presença de uma membrana externa rica em lipopolissacarídeos (LPS) que recobre sua parede celular (Sedgley & Samaranayake, 1994). Essa membrana evita que certos fármacos e antimicrobianos penetrem na célula, o que explica parcialmente a razão por que são habitualmente mais resistentes aos antimicrobianos do que bactérias Gram-positivas (Plésiat & Nikaido, 2002). Essas bactérias

apresentam uma grande capacidade de trocar material genético, entre cepas da mesma espécie ou espécies diferentes. Dentre os principais bacilos Gram-negativos (BGN) encontram-se *Campylobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., e *Pseudomonas* spp. Esses microrganismos apresentam uma gama de fatores de virulência associados ao desenvolvimento e gravidade de várias infecções em humanos. Diversas espécies estão associadas a infecções como infecções intestinais, urinárias e as hospitalares (Sedgley & Samaranyake, 1994).

Os BGN são divididos em 2 grandes grupos, os fermentadores e não fermentadores de glicose. Os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF) constituem um grupo extremamente variado, são microrganismos aeróbios, não esporulados e se caracterizam pela incapacidade de utilizar carboidratos como fonte de energia por meio de fermentação, degradando-os pela via não oxidativa (Figura 4) (Koneman *et al.*, 2001; ANVISA, 2008). Os mesmos possuem como características: mínimas necessidades nutricionais, tolerabilidade a diferentes condições físicas, capacidade de escape dos mecanismos de defesa do hospedeiro, bem como sua capacidade de resistência aos antimicrobianos (Pollack, 2000). Desde a década de 1970, infecções por BGNNF tem preocupado as instituições hospitalares por apresentarem sensibilidade diminuída a uma variedade de antimicrobianos. Essas infecções podem ter origem endógena ou exógena, dependendo de diversos fatores, como uso de substâncias imunossupressoras, utilização abusiva de agentes antimicrobianos de amplo espectro, procedimentos cirúrgicos prolongados e instrumentação mecânica inadequada (Bonnet *et al.*, 2019), visto que esses microrganismos normalmente estão relacionados com infecções hospitalares (Figueiredo-Mendes *et al.*, 2005; Nouér, 2008). Seus principais representantes são *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* e *Burkholderia cepacia*.

Já os BGN fermentadores (Figura 4) utilizam carboidratos como fonte de energia por meio de fermentação, degradando-os pela via oxidativa, são muito abundantes, incluindo uma grande variedade de bactérias patogênicas. Alguns BGN pertencem à microbiota normal dos intestinos de seres humanos e animais, como *Escherichia coli*, outros são habitantes do solo ou da água, e outros podem estar implicados em vários processos patogênicos, incluindo por exemplo os gêneros *Salmonella*, *Proteus*, *Shigella* e *Yersinia*. De maneira geral, apresentam exigências nutricionais simples e quando comparados com os BGNNF, são mais virulentos, apresentando uma série de fatores de virulência, como endotoxinas, presença de cápsula, sequestro de fatores de crescimento entre outros. Seus principais representantes são *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter asburiae*, *E. coli* e outros.





**Figura 4.** Diferenciação de bacilos Gram-negativos em meio Mac Conkey: à esquerda observa-se um bacilo fermentador (cepa de *E. coli*) e à direita, bacilo Gram-negativo não fermentador (cepa de *P. aeruginosa*).

A presença dessas espécies na microbiota oral tem sido pouco explorada. Espécies de enterobactérias e *Pseudomonas* são consideradas patógenos oportunistas comuns em humanos (Bodey *et al.*, 1983; Livrelli *et al.*, 1996; Aucken *et al.*, 1998). Pesquisas epidemiológicas de diversas partes do mundo relatam diferentes taxas de prevalência desses organismos na cavidade oral de indivíduos saudáveis (Campos & Zelante, 1978; Sedgley & Samaranayake, 1994; Santos, 1996, Sedgley *et al.*, 1996,1997). Os mesmos já foram identificados em pacientes com periodontite, entretanto sua prevalência na bolsa periodontal pode variar amplamente entre as diferentes populações. Nos Estados Unidos foram encontrados em 14 % de indivíduos portadores de doença periodontal (Slots *et al.*, 1990), na Romênia em 61.1 % (Ali *et al.*, 1996) e em 92% em pacientes com periodontite no Sudão (Ali *et al.*, 1994). A alta prevalência em determinadas localizações pode ser atribuída à contaminação de água potável ou alimentos ou devido a uma ineficiente higiene oral (Slots *et al.*, 1991), além do uso de antimicrobianos, levando ao crescimento excessivo ou colonização por organismos multirresistente na região subgingival (Ali *et al.*, 1994). Aravindhan e colaboradores (2018) detectaram uma prevalência de 71% de enterobactérias em indivíduos com saúde periodontal e 83% na periodontite na população indiana. Já na América latina foi detectado uma prevalência de 34% na cavidade oral (Gamboa *et al.*, 2013). Na população brasileira, Barbosa e colaboradores (2001) identificaram uma alta prevalência de enterobactérias e *Pseudomonas* spp. em pacientes portadores de DPs, sendo encontrada alta susceptibilidade a ciprofloxacina. Gonçalves e colaboradores (2007) avaliaram isolados de enterobactérias de sítios subgingivais de pacientes

com periodontite crônica, sendo identificado em 20% dos isolados esses microrganismos, presença de enzimas hidrolíticas como gelatinases, caseinases e elastases, bem como um alto índice de resistência para antimicrobianos como ampicilina (93.7%), amoxicilina-clavulanato (81.2%) e presença de 8 cepas multirresistentes. Já, Souto *et al.* (2014) investigaram a prevalência de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. no biofilme subgengival e na saliva de pacientes com doença periodontal e saudáveis e esses microrganismos foram detectadas em 40% e 45% de todas as amostras, respectivamente, sendo as frequências significativamente maiores nos indivíduos com periodontite em relação aos com saúde periodontal. Estudos antigos que utilizaram métodos de cultivo bacteriano demonstraram a presença de BGN em aproximadamente um terço na microbiota subgengival, normalmente associados à periodontite refratária (Slots *et al.*, 1988; Slots *et al.*, 1990; Slots *et al.*, 1991). Posteriormente, outros autores demonstraram que essas espécies são detectadas com certa prevalência no biofilme periodontal, principalmente em condições de doença. Entretanto, seu papel na etiopatogenia dessas infecções ainda não está esclarecido (Colombo *et al.*, 2005; Silva- Boghossian *et al.*, 2011).

## 1.5 Enterococos

O gênero *Enterococcus* pertencente à família *Enterococcaceae*, constituindo um grupo de bactérias de forma ovóide, Gram-positivas comensais que habitam o trato gastrointestinal, vaginal, além da cavidade oral (Jett *et al.*, 1994). No entanto, os mesmos são considerados microrganismos ubíquos, podendo ocupar diferentes nichos ecológicos como plantas, vegetais, alimentos crus e fermentados, solos e águas superficiais, entre outros (Giraffa, 2002; Semedo-Lemsaddek *et al.*, 2009; Lemsaddek & Tenreiro, 2011). Podem ser isolados através do meio diferencial e seletivo agar bile esculina (ABE) e causam uma série de doenças infecciosas, como endocardite, septicemia, abscessos e vários outros tipos de superinfecções, principalmente em pacientes idosos e imunocomprometidos (Murray, 1970).

Devido à resistência a diversos antimicrobianos, como penicilinas, aminoglicosídeos e atualmente vancomicina, infecções causadas por esses microrganismos são muito difíceis de serem tratadas (Elsner *et al.*, 2000). Apesar dos enterococos serem considerados “*low-level pathogens*”, a presença de resistência intrínseca a vários antimicrobianos, bem como sua capacidade de adquirir resistência a diversos antimicrobianos disponíveis para tratamento clínico, merecem atenção (Giraffa, 2002; Vignaroli *et al.*, 2011).

Enterococos orais, principalmente *E. faecalis*, tem sido encontrados na placa supragengival, saliva, dorso da língua e na mucosa oral (Burnett & Scherp 1951; Gold *et al.*, 1975; McCrary *et al.*, 1989; Rams *et al.*, 1990), chegando a uma prevalência de até 16.6% numa população Brasileira (Komiyama *et al.*, 2016). Também têm sido isolados de pacientes com periodontite (Rams *et al.*, 1992) e em infecções endodônticas (Siqueira *et al.*, 2002). Nesse último caso, esta espécie está associada ao insucesso no tratamento endodôntico e persistência da infecção (Roças *et al.*, 2004). Rams e colaboradores (1992) detectaram através do método de cultivo e isolamento bacteriano aproximadamente 1% de *E. faecalis* em pacientes portadores de periodontite agressiva e em 5% de pacientes com periodontite crônica. Já Souto & Colombo (2008) detectaram *E. faecalis* em 34.9 % de amostras de saliva e biofilme subgengival através da técnica de PCR, sendo 47.8 % em pacientes portadores de doença periodontal e 17.1 % em saúde periodontal. Além disso, correlações positivas foram observadas entre *E. faecalis* e parâmetros clínicos de destruição periodontal, inflamação e má higiene oral, indicando que a bolsa periodontal pode servir como reservatório desta espécie, favorecendo sua colonização.

### 1.5.1 Fatores de Virulência dos Enterococos

A resistência a antimicrobianos em enterococos não é suficiente para explicar a virulência destas bactérias (Franz *et al.*, 2001; Moreno *et al.*, 2006). No passado, considerava-se que os enterococos possuíam características de virulência sutis, que eram difíceis de se identificar. No entanto, avanços na identificação de fatores de virulência de isolados clínicos indicaram que cada um deles pode estar associado a uma ou a mais fases da infecção (Franz *et al.*, 2003). Os fatores de virulência em enterococos incluem fatores associados com a colonização e invasão dos tecidos, assim como resistência específica e não específica aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Tabela 1). Além disso, estirpes virulentas podem provocar mudanças patológicas, diretamente por produção de toxinas ou indiretamente por inflamação (Franz *et al.*, 2011). Certas características do hospedeiro humano possuem um importante papel no que diz respeito à sua susceptibilidade ou resistência à infecção, incluindo *stress* físico e emocional, idade, higiene pessoal e estado geral de saúde e nutricional.

As adesinas são responsáveis pela aderência aos tecidos do hospedeiro, etapa fundamental no processo infeccioso. As mesmas têm como objetivo promover a ligação aos receptores das células hospedeiras, importante papel no estabelecimento e manutenção da colonização (Semedo *et al.*, 2003a; Carlos *et al.*, 2010). Além de promoverem a ligação a componentes da matriz extracelular, a células eucarióticas e a linhas celulares humanas, as

adesinas também promovem a ligação a componentes abióticos (Semedo-Lemsaddek & Mato, 2011). A proteína de superfície *esp* (*enterococcal surface protein*), observada em isolados clínicos de *E. faecalis* é uma proteína extracelular de elevada massa molecular, codificada cromossomicamente pelo gene *esp* (Shankar *et al.*, 1999). O seu papel na virulência em enterococos ainda está sob análise. Entretanto, a elevada prevalência do gene *esp* em isolados clínicos, evidencia indiretamente que este contribui para a patogenicidade de enterococos e para a sua transmissão em infecções nosocomiais. Além disso, estudos sugerem que *esp* possa contribuir para a colonização e persistência de enterococos em células epiteliais do trato urinário, na matriz extracelular do hospedeiro humano e na formação de biofilmes em superfícies abióticas. (Semedo-Lemsaddek & Mato, 2011). Outro fator de virulência bastante estudado nos enterococos corresponde a gelatinase, sendo caracterizada como uma metaloendopeptidase extracelular capaz de hidrolisar gelatina, colágeno, fibrinogênio, caseína e outros pequenos peptídeos biologicamente ativos, sendo produzida por um grande número de células eucarióticas, visto que no hospedeiro faz parte do processo fisiológico normal, como por exemplo, na regulação da formação e remodelação tecidual, sugerindo a sua participação no início e propagação do processo inflamatório (Semedo *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2009; Lindenstrauß *et al.*, 2011). Em pacientes com periodontite e que apresentam grandes quantidades de *E. faecalis*, os níveis de gelatinase podem encontrar-se elevados no fluido gengival e na saliva, assim a hidrólise do colágeno pela gelatinase pode ter um papel importante na patogênese e propagação de inflamações periapicais (Tsikrikonis *et al.*, 2012). O gene *gelE* codifica a gelatinase e está localizado junto ao gene *sprE*, que codifica uma endopeptidase de serina. Além desses, existem outros fatores de virulência responsáveis pelo processo infeccioso como hemolisinas, geralmente relacionadas às citolisinas, adesinas na parede celular, adesinas de colágeno, substância de agregação (Foulquié-Moreno *et al.*, 2006), sendo listados na tabela abaixo, bem como sua indicação da possível associação com o estágio de virulência do hospedeiro (Franz & Holzapfel, 2006).

**Tabela 1.** Principais fatores de virulência e sua possível associação com o estágio de infecção por *Enterococcus* spp.

Determinante de virulência	Possível associação com o estágio de virulência
Adesinas de colágeno ( <i>ace</i> )	Adesão da matriz protéica extracelular e invasão da resposta imune.
Adesinas de parede celular ( <i>efaA</i> )	Adesinas que promovem o desenvolvimento de endocardites.
Biofilme de superfícies plásticas ( <i>bopD</i> )	Formação de biofilme em superfícies abióticas.
Substâncias de agregação ( <i>asa</i> e <i>asa 373</i> )	Adesinas que promovem a colonização; adesão da matriz protéica extracelular (promove o deslocamento); aumento da sobrevivência das células imunes (evasão da resposta imune do hospedeiro).
Citolisinas ( <i>cyIA</i> )	Toxina para célula eucariótica e lise das células imunes (evasão da resposta imune do hospedeiro).
Proteínas de superfície ( <i>esp</i> )	Adesinas que promove a colonização e invasão da resposta imune.
Gelatinase ( <i>gelE</i> )	Hidrólise de diversos peptídeos biológicos (colágeno, fibrina) e hidrólise de peptídeos antibacterianos (evasão da resposta imune natural do hospedeiro).
<i>ef1841/fsrC</i>	Regulam a expressão de <i>gelE</i> , <i>sprE</i> são necessários para a atividade das proteases, gelatinase ( <i>gelE</i> ) e endopeptidase de serina ( <i>sprE</i> ).

**Fonte:** Adaptado de Franz & Holzapfel, 2006

## 1.6 Resistência Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana corresponde a uma resposta biológica natural dos microrganismos frente a uma pressão seletiva, como condições climáticas, disponibilidade de nutrientes, oxigênio, água ou a presença de um antimicrobiano. Quando uma nova classe de antibiótico é introduzida, inicialmente é eficaz, entretanto eventualmente ocorrerá uma seleção

de uma pequena fração bacteriana sobrevivente através de mecanismos de resistência intrínseca e/ou adquirida (Walsh, 2003).

A mesma é atualmente considerada um problema grave de saúde pública segundo a *World Economic Forum Global Risks*, listada como uma das grandes ameaças à saúde humana (Blair *et al.*, 2015). Logo, deve-se considerar de forma multidisciplinar o maior número possível de pontos estratégicos de ação, contemplando desde a natureza das doenças infecciosas, os procedimentos farmacoterapêuticos existentes, os fatores ambientais, políticos e sócio-econômicos pertinentes à questão, visto que não há uma solução definitiva para a resistência antimicrobiana em função da dinamicidade da evolução biológica dos microrganismos vivos (Costa & Silva Júnior, 2017).

Dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2015) revelaram altos níveis de resistência a uma série de infecções bacterianas graves tanto em países de alta, como de baixa renda. De acordo com o *Global Antimicrobial Surveillance System (GLASS, 2018)*, há uma ocorrência generalizada de resistência aos antibióticos entre 500 mil pessoas com suspeita de infecção bacteriana em 22 países. Em termos de saúde pública, a resistência antimicrobiana representa um risco à qualidade de vida humana conquistada ao longo dos anos com o avanço da microbiologia, das engenharias, da farmácia e da medicina, comprometendo o orçamento dos sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados, além de intensificar outro problema de saúde pública de grande relevância que são as infecções hospitalares. O consumo global de antibióticos aumentou quase 40% entre 2000 e 2010, e pelo menos 50.000 mortes resultaram de infecções decorrentes da resistência a antimicrobianos a cada ano em toda a Europa e nos Estados Unidos (Van Boeckel *et al.*, 2014).

No Brasil, estima-se que aproximadamente 23.000 mortes são causadas anualmente (BBC Brasil, 2017). O uso abusivo de antimicrobianos contribuiu para o aumento da resistência em várias espécies bacterianas (Van Hoek *et al.*, 2011), além da possibilidade de transferência dos elementos genéticos móveis determinantes da resistência, o que gera uma disseminação mundial dos patógenos resistentes aos antimicrobianos (O'Neill, 2014).

A OMS criou um plano de ação frente a resistência antimicrobiana, com o objetivo de garantir a eficácia dos antimicrobianos na prevenção e tratamento das infecções. Algumas ações foram propostas, como o estímulo a novas pesquisas sobre resistência e a criação de novos antimicrobianos (WHO, 2015). O “Plano de Ação Global para o Enfrentamento à Resistência aos Antimicrobianos”, organizado em parceria com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) enfatiza 5 objetivos estratégicos, dentre eles, uma melhor conscientização e compreensão

da resistência antimicrobiana; fortalecimento do conhecimento por meio da vigilância e da pesquisa; redução na incidência de infecções; otimização no uso de agentes antimicrobianos; e assegurar investimentos sustentáveis na luta contra a resistência antimicrobiana.

Mobilizado pelas discussões do Plano Global e pelos compromissos internacionalmente firmados nos fóruns multilaterais, o governo brasileiro elaborou o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR). O PAN-BR baseia-se nos princípios orientadores definidos pela OMS, pela FAO e pela OIE, enfatizando, uma abordagem multissetorial, envolvendo diretamente o Ministério da Saúde, a ANVISA e o MAPA, e conta com o apoio do Ministério do Meio Ambiente, da Fundação Nacional de Saúde e outros órgãos, sendo composto por 8 eixos estratégicos, operacionais e de monitoramento no período de 2018 a 2022 (Estrela, 2018).

Quando um microrganismo é continuamente exposto a um nível sub-letal de um agente antimicrobiano, desenvolve mecanismos de resistência à sua ação. Este fato pode ser causado por uma diversidade de fatores, como alterações espontâneas na estrutura genética de uma célula ou através da incorporação estável de elementos genéticos móveis, que apresentam genes de resistência antimicrobiana, pelos quais as bactérias transferem livremente entre elas. De fato, os microrganismos têm a capacidade de se tornarem resistentes a uma vasta gama de agentes antimicrobianos, que podem disseminar-se por várias vias em humanos, animais, alimentos e no meio ambiente. Basicamente existem 2 mecanismos associados à resistência antimicrobiana:

1) Resistência intrínseca ou natural: em que os microrganismos não são susceptíveis a um determinado antimicrobiano porque o alvo específico da atuação não se encontra presente. Por exemplo, certas bactérias orais, como muitos estreptococos necessita da presença de nitroredutases para converter o metronidazol e seus metabólitos ativos e, portanto, não são afetados pela droga já que elas não apresentam essas enzimas (Walker, 1996).

2) Resistência adquirida: refere-se à transferência horizontal de elementos genéticos que codificam a resistência aos antibiótico. Este processo pode ocorrer por transdução, transformação ou conjugação. Através de diferentes mecanismos, as bactérias podem desenvolver resistência antimicrobiana, seja pela aquisição de um material genético ou por mutação e/ou modificações. Diferente da resistência natural, a resistência adquirida pode ser transferida, se o componente genético que causa um fenótipo resistente é codificado em um elemento genético móvel, por exemplo, plasmídeo, pode ocorrer a transferência facilmente daquele mecanismo de resistência, como por exemplo para a produção da enzima de ESB, importante fator de resistência para os BGN (Tenover, 2006; Adler *et al.*, 2012).

As espécies bacterianas resistentes ainda podem ser classificadas em multirresistentes, bactérias não susceptíveis a pelo menos um agente em 3 ou mais classes de antimicrobianos; extensivamente resistentes, quando não são susceptíveis a pelo menos um agente em quase todas as classes antimicrobianas, sendo sensível apenas uma ou duas classes e pan-resistentes quando as estipes não são susceptíveis a todos os antimicrobianos em todas as classes antimicrobianas (Magiorakos *et al.*, 2012).

A OMS em 2017 divulgou uma lista de bactérias que necessitam de novos antimicrobianos para o seu controle. Foi subdividida a lista em grupos, sendo considerados em níveis críticos, alto e médio. No grupo crítico estão presentes espécies da família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemas, além de *P. aeruginosa*, *A.baumannii*; no grupo alto, presença de *Enterococcus faecium* resistentes à vancomicina, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e com resistência intermediária e total à vancomicina e outras espécies. Já para o grupo médio, presença de *Streptococcus pneumoniae* não sensíveis à penicilina, *Haemophilus influenzae* resistentes à ampicilina e espécies de *Shigella* resistentes a fluorquinolonas (WHO, 2017). O objetivo dessa lista foi dar uma maior ênfase na problemática da resistência antimicrobiana, e vale salientar que como prioridade da lista a presença de microrganismos Gram-negativos em virtude do crescente surgimento da resistência (O'Neill, 2014). São necessários mais estudos para controlar os mecanismos de disseminação, distribuição e caracterização desses fatores de resistência.



## 2. JUSTIFICATIVA

Um grande número de trabalhos tem sugerido que as infecções orais, especialmente a DP, podem contribuir ou favorecer o estabelecimento de uma variedade de doenças sistêmicas graves. Esses dados demonstram uma maior necessidade da implementação de medidas preventivas e no controle das doenças orais, a fim de se eliminar focos infecciosos e, conseqüentemente, possíveis doenças sistêmicas. Existe a possibilidade de indivíduos com bolsas periodontais mais profundas possuírem maiores concentrações de patógenos não orais do que indivíduos saudáveis. Isso se torna ainda mais problemático quando essas espécies apresentam maior virulência e resistência, como no caso de cepas multirresistentes.

Atualmente, a resistência aos antimicrobianos, principalmente em BGN (*A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*) e *Enterococcus faecium* é alarmante. Indivíduos portadores dessas espécies, quando submetidos a procedimentos cirúrgicos, internação hospitalar ou a condições de imunossupressão, podem constituir-se em fontes de infecção e reinfecção para eles mesmos, outros indivíduos e para o meio ambiente. Essa disseminação pode ser ainda mais evidente em pacientes com má higiene oral e com DPs, nos quais essas espécies podem atingir números bem elevados. Além da possibilidade dessas cepas resistentes a vários antimicrobianos se disseminarem para outras partes do organismo ou, até mesmo para outros indivíduos e comunidades, elas podem transferir essa resistência para cepas orais. Por exemplo, em um indivíduo com periodontite crônica avançada, cepas de patógenos periodontais podem adquirir genes de resistência de espécies não orais, tornando-se mais difíceis de serem controlados através da terapia periodontal convencional associada ou não ao uso de antimicrobianos. Pacientes com periodontite refratária são um exemplo no qual a caracterização da microbiota subgingival é de extrema importância para a avaliação da terapia a ser empregada (Adams, 1992; Fine, 1994; Newman *et al.*, 1994; Colombo *et al.*, 1998). Não existem dados na literatura em relação a esta temática, sendo informações sobre a prevalência e as proporções dessas espécies de importância médica na cavidade oral limitadas, faz-se necessário mais estudos com o objetivo de contribuir no rastreamento dessas na cavidade oral, e possivelmente para a instituição de medidas profiláticas e terapêuticas para o controle da disseminação de resistência aos antimicrobianos.

### **3.PROPOSIÇÃO**

A hipótese do nosso estudo é de que pacientes com doença periodontal (periodontite e gengivite) apresentem maiores prevalência dos microrganismos de importância médica no biofilme subgengival, bem como presença de genes de virulência e um maior perfil de resistência aos antimicrobianos quando comparados com indivíduos com saúde periodontal.

Baseado nessa hipótese o presente trabalho tem como objetivo de identificar e determinar a prevalência de microrganismos patogênicos de importância médica, em particular Bacilos Gram-negativos e enterococos, seus fatores de virulência e seu perfil de susceptibilidade a antimicrobianos no biofilme subgengival de indivíduos de uma amostra da população brasileira com diferentes condições clínicas periodontais.

Além disso, correlacionar diferentes espécies desses grupos patogênicos com espécies orais do biofilme subgengival, parâmetros clínicos periodontais e características demográficas/comportamentais dessa amostra populacional.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Amostra Populacional

Os participantes incluídos no estudo foram recrutados da Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), RJ, Brasil. A amostra foi constituída de indivíduos diagnosticados com saúde periodontal (SP), gengivite (G) e periodontite (P). Foram considerados pacientes com saúde periodontal os que apresentavam menos de 10% dos sítios com sangramento à sondagem (SS) e profundidade de sondagem (PS) e/ou nível clínico de inserção (NCI)  $\leq 3$  mm, podendo apresentar PS ou NCI = 4 mm em até 5% dos sítios, sem SS concomitante. Pacientes diagnosticados com gengivite tinham 10% dos sítios com SS e PS e/ou NCI  $\leq 3$  mm, podendo apresentar PS ou NCI = 4 mm em até 5% dos sítios, sem SS concomitante. Portadores de doença periodontal apresentavam no mínimo 10% dos dentes com NCI e/ou PS  $\geq 5$  mm, ou  $\geq 15\%$  dos dentes com NCI e/ou PS  $\geq 4$ mm, e SS concomitante segundo a classificação de Boghossian *et al.*, 2008 com adaptações da classificação periodontal vigente (Caton *et al.*, 2018). Todos os pacientes tinham pelo menos 18 anos e no mínimo 18 dentes presentes. Os critérios de exclusão foram: realização de tratamento periodontal ou profilaxia até 6 meses antes do exame inicial, terapia antimicrobiana local ou sistêmica nos últimos 6 meses anteriores ao exame clínico inicial, uso de anti-inflamatórios nos últimos 3 meses, indivíduos sob tratamento ortodôntico, diabéticos, imunossuprimidos, grávidas ou lactantes. Antes do início do tratamento todos os pacientes foram esclarecidos quanto aos riscos e benefícios do tratamento, e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da UFRJ (707.510) (Anexo I).

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando-se o programa estatístico Gpower versão 3.1.9.2 (Franz Faul, Universitat Kiel, Alemanha). Considerando a hipótese de que pacientes com doença periodontal apresentam maior prevalência de bacilos Gram-negativos e enterococos em relação a indivíduos com saúde periodontal, estimamos uma diferença de 15% na prevalência desses microrganismos entre os grupos clínicos, baseando-se em dados disponíveis na literatura. Assim, considerando-se um erro alfa de 5%, 85% de poder, uma razão de 2:1 de casos/controles e uma possível perda de 15%, um total de 175 indivíduos

no grupo com doença periodontal (gingivite e periodontite) e 87 no grupo com saúde foram estimados.

#### **4.2 Exame Clínico Periodontal**

Os exames clínicos foram realizados nas instalações da Disciplina de Periodontia do Departamento de Clínica Odontológica da FO-UFRJ e incluíram anamnese médica e odontológica. As medidas clínicas periodontais foram realizadas utilizando-se espelho plano número 5 e sonda periodontal milimetrada Carolina do Norte (UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, EUA). Todos os exames foram executados por um único examinador treinado e calibrado. Os parâmetros clínicos periodontais que foram avaliados incluirão IP (Índice de placa), SS, IG (Índice gengival), CA (Índice de cálculo), SUP (Presença de supuração), além das medidas de PS e o NCI (mm). Essas medições foram realizadas em 6 sítios por dente (mésio-vestibular, vestibular, disto-vestibular, mésio-lingual, lingual, disto-lingual), de todos os dentes, com exceção dos terceiros molares.

#### **4.3 Reprodutibilidade Intra-Examinador**

A calibração do examinador envolveu o exame de 20 indivíduos com diagnóstico de saúde periodontal, gingivite e periodontite leve, moderada e avançada, que não participaram do estudo. Os exames periodontais foram realizados em cada indivíduo com uma semana de intervalo entre eles. Para os parâmetros (PS e NCI), foi calculado o coeficiente de correlação intraclasse (ICC) foi de 0.90 e 0.92, com uma diferença  $\leq 1$  mm.

#### **4.4 Coleta de Amostras para Análise Microbiológica**

No exame clínico, amostras de biofilme subgengival foram coletadas de 14 sítios periodontais (7 sítios saudáveis e 7 sítios doentes mais profundos) de pacientes com periodontite, 14 sítios saudáveis de indivíduos com saúde periodontal, e 14 sítios (7 sítios saudáveis e 7 sítios com inflamação gengival) de pacientes com gingivite. Após remoção da placa supragengival com gaze estéril, o biofilme subgengival foi removido individualmente dos sítios selecionados com curetas gracey estéreis, sob isolamento relativo. Cada amostra de biofilme foi armazenada em um microtubo estéril contendo 150  $\mu$ L de tampão tris-EDTA (TE; 10 mM de Tris HCl, 1 mM de EDTA, pH 7,6). Em seguida, foram adicionados 150  $\mu$ L de 0,5

M NaOH a cada microtubo.

Em seguida, novas amostras de biofilme subgingival obtidas de outros sítios periodontais diferentes dos sítios inicialmente coletados foram obtidas. Nos pacientes saudáveis, foram obtidas amostras de 2 sítios sadios (1 dente posterior e um dente anterior) por quadrante, totalizando 8 amostras por paciente. O mesmo procedimento foi realizado nos pacientes com gengivite (8 amostras de sítios com gengivite) e periodontite (8 amostras das bolsas periodontais com maior profundidade). Essas amostras foram colocadas em tubos criogênicos (pool de 8 amostras/tubo/paciente) contendo caldo de Micoplasma com 5% de DMSO (Sigma, São Paulo, Brasil), e imediatamente foram conduzidas ao laboratório de Microbiologia Oral para processamento adequado.

#### **4.5 Análise Microbiológica através da técnica de *Checkerboard DNA-DNA hybridization***

A identificação dos microrganismos no biofilme subgingival foi realizada através da técnica descrita por Socransky *et al.* (1994), com modificações (Colombo *et al.*, 2006, Heller *et al.*, 2011). As suspensões de biofilme foram fervidas por 10 min, e em seguida neutralizadas pela adição de 0,8 mL de 5 M de acetato de amônia. Cada suspensão contendo DNA livre foi depositada nas fendas do “Minislot 30” (Immunetics, Cambridge, MA, EUA) e o DNA concentrado numa membrana de nylon (GE Healthcare Life Sciences, São Paulo, SP, Brasil). O DNA depositado na membrana foi fixado através da exposição à temperatura de 120°C por 20 min em forno (Fanem Ltda., São Paulo, SP, Brasil). As duas últimas canaletas do “Minislot” foram reservadas para a colocação dos controles, contendo uma mistura das espécies de microrganismos investigados pelas sondas de DNA, em duas concentrações,  $10^5$  e  $10^6$  células bacterianas. Após fixação do DNA nas membranas, essas foram pré-hibridizadas a 42°C por 1 h numa solução contendo 50% de formamida, 1% de caseína, 5 x SSC, 25 mM de fosfato de sódio (pH 6,5) e 0,5 mg/mL de RNA de levedura. Em seguida, cada membrana foi colocada sob a placa acrílica do “Miniblotter 45” (Immunetics) com as linhas contendo o DNA fixado perpendiculares às canaletas do “Miniblotter 45”. Em cada canaleta foram colocadas 135 µL de cada sonda específica diluída em solução de hibridização contendo 45% de formamida, 5 X SSC, 20 mM de fosfato de sódio (pH 6,5), 0,2 mg/ mL de RNA de levedura, 10% de sulfato de dextrano, 1% caseína e 20 ng/ mL de sonda da DNA específica. O aparato foi então incubado a 42°C por no mínimo 16 h para hibridização. As sondas genômicas para as espécies bacterianas (Table 1S manuscrito II) foram confeccionadas usando o “Random Primer

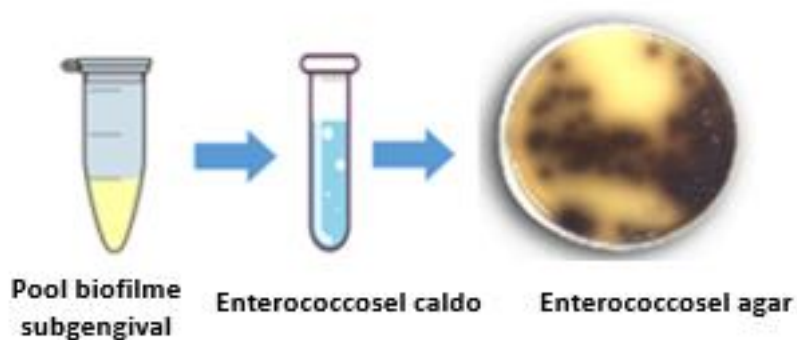
Digoxigenin Labeling Kit” (Roche Applied Science, São Paulo, SP, Brasil). 45 sondas genômicas foram utilizadas para 85 espécies orais e não-orais. O DNA dos sorotipos a, b e c do *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) foi agrupado em uma sonda, assim como o DNA de *Propionibacterium acnes* I e II. *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* foram combinados em uma sonda de *Enterobacteriaceae*. O DNA de *Neisseria subflava*, *Neisseria polysaccharea*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria sicca*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Neisseria lactamica* foi reunido em uma sonda de *Neisseria*. Outras sondas combinadas incluíram *Actinomyces* spp., *Campylobacter* spp., *Capnocytophaga* spp., *Eubacterium* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Gemella* spp., *Lactobacillus* spp., *Prevotella* spp., *Prevotella* spp., Estafilococos de coagulase negativos.

Após hibridização com as sondas, as membranas foram lavadas por 5 min em temperatura ambiente, seguido de duas lavagens de 20 min a 68°C em solução adstringente (0,1 X SSC, 0,1% SDS), imersas em solução bloqueadora (0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20 e 0,5% de caseína, pH 8,0) por 1 h, e incubadas por 30 min na mesma solução bloqueadora agora contendo o anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina (Roche Applied Science) numa diluição de 1/25.000. As membranas foram, então, lavadas em solução tampão (0,1 M de ácido maleico, 3 M de NaCl, 0,2 M de NaOH, 0,3% de Tween 20, pH 8,0) duas vezes por 15 min, e uma vez por 5 min em uma solução contendo 0,2 M de Dietanolamina (pH 9,5) e 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Em seguida, uma solução detectora de fluorescência (AttoPhos® AP Fluorescent Substrate System, Promega Corporation, Madison, WI, EUA) foi adicionada às membranas. Finalmente, as membranas foram escaneadas e as imagens captadas pelo Sistema de Imagens Storm TM 860 (Molecular Dynamics, GE Healthcare Life Sciences), utilizando-se o *software* ImageQuant versão 5.2 (GE Healthcare Life Sciences). Os sinais emitidos foram avaliados visualmente por comparação com os controles de 10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> células bacterianas para as espécies testes na mesma membrana. Os sinais foram registrados como: 0: não detectado; 1: <10<sup>5</sup> células; 2: ~10<sup>5</sup> células; 3: 10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células; 4: ~10<sup>6</sup> células; 5: >10<sup>6</sup> células. A sensibilidade da técnica desse teste foi ajustada para permitir a detecção a partir de 10<sup>4</sup> células de uma determinada espécie, através do ajuste de cada sonda de DNA. Este procedimento foi realizado com o objetivo de se obter a mesma sensibilidade de detecção para cada espécie. A ausência de detecção foi computada como zero, no entanto níveis entre 1-1000 poderiam estar presentes.

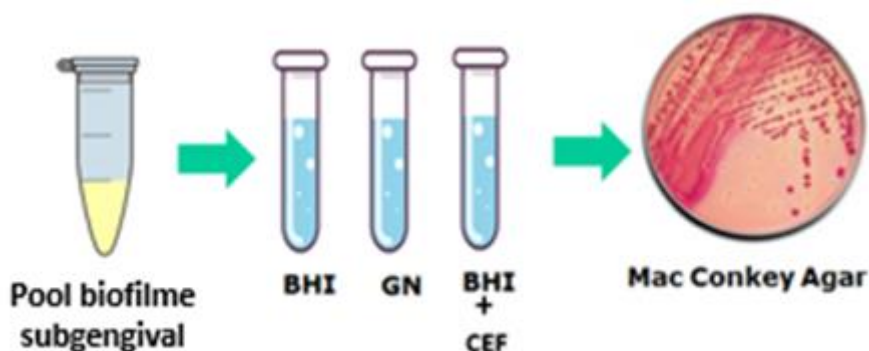
#### 4.6 Identificação e caracterização fenotípica de *Enterococcus* spp. e Bacilos Gram-negativos

Foram realizados o isolamento e cultivo de cepas de *Enterococcus* para avaliação de fatores de virulência e perfil de susceptibilidade diretamente após a coleta das amostras. As amostras estocadas em tubos criogênicos contendo caldo Micoplasma com 5% de DMSO foram transferidas para tubos contendo 5 ml de caldo Enterococcosel e caldo BHI (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemanha) e incubadas a 37°C por um período de até 48 horas. As amostras crescidas em Enterococcosel e BHI foram inoculadas em placas contendo Agar Bile Esculina (ABE) (Plastlabor) e incubadas a 37°C por até 48 horas (Figura 5). As amostras foram caracterizadas como *Enterococcus* através da hidrólise da esculina em presença de bile, aspecto morfotintorial através da coloração de Gram, sendo a positividade do teste feita pelo escurecimento do meio, em função da hidrólise da esculina em esculetina, na presença de 40% de bile (v/v). Sendo posteriormente as amostras de enterococos confirmadas através da Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF Microflex LT, Bruker Daltonics). As amostras negativas foram confirmadas após 7 dias de incubação. As cepas identificadas como enterococos foram recultivadas para estocagem em caldo Micoplasma com 5% DMSO, e, também, inoculadas em meio *Mueller-Hinton* para a realização do antibiograma.

Já para o isolamento e cultivo dos Bacilos Gram-negativos, após a coleta do biofilme subgengival, as amostras estocadas em tubos criogênicos contendo Micoplasma-DMSO foram transferidas para tubos contendo 5 ml de caldo GN, caldo BHI, caldo BHI com 10 µg de Ceftriaxona (DME- Diagnósticos Microbiológicos Especializados, Araçatuba, São Paulo) e incubadas a 37°C por um período de até 48 horas como demonstrado na Figura 6. As amostras crescidas foram inoculadas em placas contendo Agar Mac Conkey (Plastlabor) e incubadas a 37°C por até 48 horas. Para confirmação da mesma foi realizada através da Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF).



**Figura 5.** Identificação e caracterização fenotípica de *Enterococcus spp.*



**Figura 6.** Identificação e caracterização fenotípica de bacilos Gram-negativos.

#### 4.6.1 Confirmação de identificação através da Espectrometria de Massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF)

Em um fluxo laminar, posterior a incubação, as colônias bacterianas isoladas foram coletadas com auxílio de palitos de madeira estéreis e em seguida depositadas em duplicata, na placa metálica (Sample target) utilizada no espectrômetro de massa MALDI-TOF Microflex LT (Bruker Daltonics). Após a completa secagem do material bacteriano, foi adicionado a cada amostra, 1  $\mu$ L da matriz composta por ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico preparado em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%. A cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  foi utilizada para calibrar as análises e como controle do processamento das amostras.

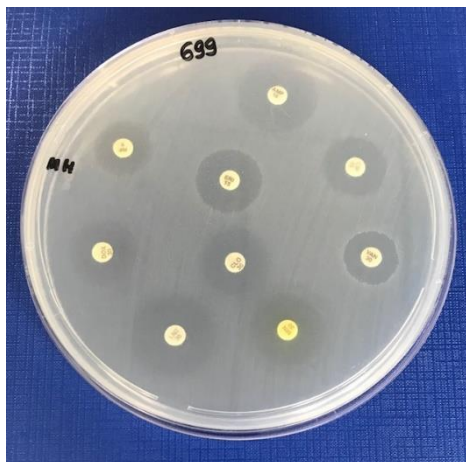
Os espectros de massa das amostras foram obtidos no modo linear, com os seguintes parâmetros: frequência de laser 20 Hz; voltagem das fontes iônicas 1 e 2, 20 k V e 18,6 k V



respectivamente; faixa de massa molecular 2.000 a 20.000 Da. Os espectros de massa foram coletados através do somatório de 240 disparos do laser, adquiridos através de 4 grupos de 60 disparos lançados em regiões distintas, aleatoriamente selecionadas, em um poço contendo a amostra alvo na placa metálica. O espectro das proteínas ribossômicas da cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  foram utilizadas como referência para calibrar os espectros das amostras. Após esta calibração, os espectros de massa obtidos para cada amostra foram processados pelo software Biotyper versão 3.1 (Bruker Daltonics), que realiza uma pesquisa em sua biblioteca de espectros de referência para encontrar o espectro que mais se assemelhava ao obtido como a referida amostra. O software designa os dez microrganismos que apresentam maior semelhança com a amostra testada, organizados de acordo com a pontuação (score) obtida, que variou entre 0,0 e 3,0. De acordo com o fabricante, o critério sobre a identificação microbiana ocorreu da seguinte maneira: Score igual ou maior que 2,3 foi considerado como identificação altamente confiável para a espécie, entre 2,00 e 2,29 foi considerado como identificação confiável para o gênero e provável para a espécie bacteriana, score entre 1,70 e 1,9 foi considerado como identificação provável apenas para o gênero bacteriano, enquanto escores de identificação abaixo de 1,69 foram classificados como não confiáveis.

#### **4.7 Determinação da Susceptibilidade aos Antimicrobianos dos Isolados de *Enterococcus* spp.**

O perfil de susceptibilidade das cepas de enterococos foi determinado frente a 9 antimicrobianos (CLSI, 2018). As amostras foram inicialmente semeadas em *Tripticase Soy Agar* (TSA), por 18 a 24 horas, a 35°C. O crescimento microbiano foi então diluído em solução salina 0.85% (p/v) para obtenção do padrão de turvação 0.5 da escala de McFarland (~108 UFC/mL), e inoculado em placa de ágar *Müller-Hinton* (Difco Laboratories), com auxílio de um “swab”, de forma a obter um crescimento confluyente. Os discos foram depositados sobre o meio e a leitura dos halos de inibição feita após 16-18h de incubação a 35°C (Figura 7). As amostras foram testadas frente aos seguintes antimicrobianos: ciprofloxacina (5 $\mu$ g), ampicilina (10 $\mu$ g), vancomicina (30 $\mu$ g), eritromicina (15 $\mu$ g), doxiciclina (30 $\mu$ g), minociclina (30 $\mu$ g), rifampicina (6 $\mu$ g), cloranfenicol (30 $\mu$ g), linezolid (30 $\mu$ g), (Cecon, Rio de Janeiro, Brasil). A interpretação do teste foi realizada conforme o CLSI (2018) e a amostra padrão *E. faecalis* ATCC 25923 utilizada como controle do teste.



**Figura 7.** Antibiograma- técnica de disco-difusão de uma cepa de *E. faecalis*.

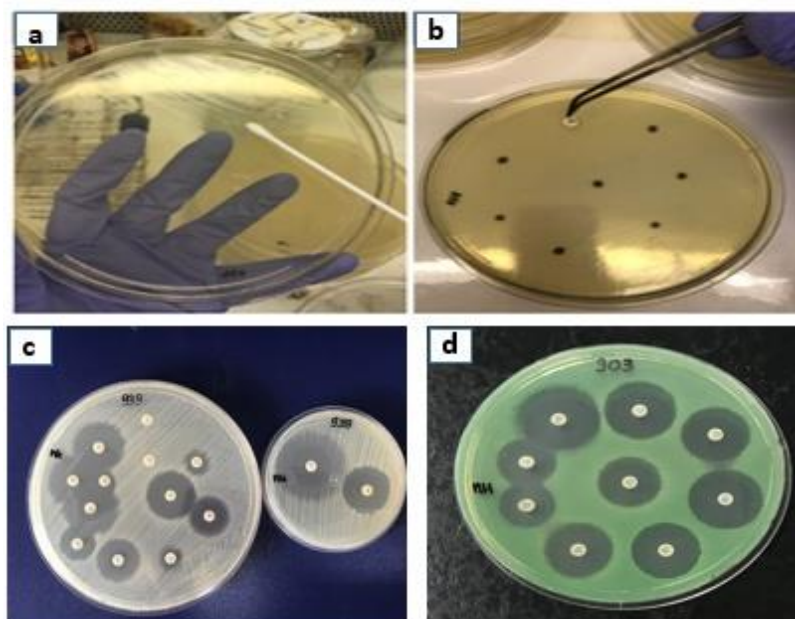
#### **4.8 Identificação Genotípica dos Fatores de Virulência das Espécies de *Enterococcus* spp.**

A extração de DNA das cepas de enterococos isoladas foi realizada pela metodologia de fenol-clorofórmio descrita por Smith e colaboradores (1989). Após extração, a concentração do DNA foi analisada pelo NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Estados Unidos da América). Através do método de PCR, foram avaliados os genes que codificam os seguintes fatores de virulência: Antígeno de ligação ao colágeno (*ace*), substância de agregação (*asa* e *asa 373*), biofilme em superfícies plásticas (*bopD*), ativador de hemolisina (*cylA*), antígeno de endocardite (*efaA*), gelatinase (*gelE*), proteína de superfície (*esp*) e o locus que regula a produção de gelatinase (*ef1841/fsrFsrC*). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50  $\mu$ l, contendo 5  $\mu$ l (~200 ng) de tampão PCR 10X (200mM de Tris-HCl, pH 8.0 e 500mM de KCl) (Invitrogen SP, Brasil), 2 mM de  $MgCl_2$  (Invitrogen), 1,25U de Taq DNA polimerase (Invitrogen) e 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatados (Invitrogen), 20 pmol de cada primer e 5  $\mu$ l de DNA das cepas isoladas das amostras clínicas. A sequência dos iniciadores, bem como as condições utilizadas para a realização do PCR de todos os fatores de virulência estão listados na Table S2 do manuscrito II.

#### **4.9 Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos dos Bacilos Gram-negativos**

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos para os BGN foi realizado para todas as cepas isoladas. As amostras inicialmente foram semeadas em TSA, por 18-24h, a 35°C. O crescimento microbiano foi então diluído em solução salina 0.85% (p/v) para obtenção do padrão de turvação 0.5 da escala de McFarland (~108 UFC/mL), e inoculado em placa de ágar

Müeller-Hinton (Difco Laboratories), com auxílio de um “swab”, de forma a obter um crescimento confluyente. Os discos foram depositados sobre o meio e a leitura dos halos de inibição feita após 16-18h de incubação a 35°C. Para as cepas isoladas de *Enterobacteriaceae* foram testadas os seguintes antimicrobianos: ampicilina (10µg), amoxicilina-clavulonato (20/10µg), cefoxitina (30µg), amicacina (30µg), gentamicina (10µg), cefalotina (30µg), cefazolina (30µg), ceftazidima (30µg), cefuroxima (30µg), cefepima (30µg), ceftriaxona (30µg), sulfametoxazol-trimetoprim (1.25/23.75µg), ciprofloxacina (5µg), imipenem (10µg) (Cecon, Rio de Janeiro, Brasil), sendo a interpretação do teste baseada no CLSI (2018) e as cepas padrão *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 utilizada como controle do teste. Para as cepas identificadas como *P. aeruginosa* foram utilizadas os antimicrobianos: piperacilina-tazobactam (100/10µg), ceftazidima (30µg), cefepima (30µg), imipenem (10µg), aztreonam (30µg), gentamicina (10µg), tobramicina (10 µg), amicacina (30 µg), ciprofloxicina (5µg)(Cecon, Rio de Janeiro, Brasil), sendo a cepa controle *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Para as espécies de *Acinetobacter*, foram utilizados ampicilina-sulbactam ( 10/10 µg), piperacilina-tazobactam ( 100/10 µg), ceftazidima (30µg), cefepima (30µg), ceftriaxona (30 µg), imipenem (10µg), gentamicina (10µg), tobramicina (10µg), amicacina (30µg), doxiciclina (30µg), minociclina (30µg), trimetoprim-sulfametaxazol ( 1.25/23.75 µg), ciprofloxacina (5µg) (Cecon, Rio de Janeiro, Brasil), sendo a *P. aeruginosa* ATCC 27853 utilizada como controle. Já para as *S. maltophilia* foram usados Trimetoprim-sulfametoxazol (1.25/23.75µg), levofloxacino (5µg), minociclina (30µg) (Cecon, Rio de Janeiro, Brasil) e a *E.coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 como controle (Figura 8).



**Figura 8:** Antibiograma. **a)** Semeadura de cepa de *Enterobacteriaceae* utilizando um inóculo de 0,5 da escala de Mcfarland sobre meio Muller-Hinton. **b)** Deposição dos discos antimicrobianos sobre a placa com o isolado semeado. **c)** Halos de inibição de crescimento de *Serratia marcescens* após 18 horas de inoculação. **d)** Halos de inibição de crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* após 18 horas de inoculação.

#### 4.9.1 Detecção de Cepas com Redução da Sensibilidade ou Resistência aos Carbapenemas para BGN

Para detecção de cepas que apresentaram redução da sensibilidade aos carbapenemas foi utilizado o protocolo de hidrólise de imipenem em espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-VIS). Foi realizado este protocolo apenas para as cepas que não apresentam resistência intrínseca aos carbapenemas. O espectro de absorção de imipenem em solução salina tamponada com fosfato (PBS) 0,1M, pH 7,0, foi realizado dentro do comprimento de onda de 297nm (Takeuchi *et al.*, 2018). Na fase pré-analítica, 500 µl de PBS foram adicionados a um microtubo, e uma quantidade robusta de bactérias inoculadas com o auxílio de uma alça descartável estéril. O material foi sonicado com cinco pulso de 5 segundos com intervalo de cinco segundos entre eles. Posteriormente, a suspensão foi centrifugada a 8,120 x g por 5 minutos e o sobrenadante recuperado. A fase analítica consistiu na de adição de 50 µl da suspensão bacteriana a 800 µl de uma solução de PBS contendo imipenem (200µg/ml). A atividade hidrolítica das cepas foi medida de acordo com a diminuição de absorbância do imipenem por leitura espectrofotométrica.

#### 4.9.2. Detecção Fenotípica de ESBL

Para a realização da detecção fenotípica da produção de ESBL, foi utilizada a metodologia do disco-aproximação (Jarlier *et al.*, 1988). Sendo preparada uma suspensão bacteriana com turbidez correspondente a 0.5 da escala de McFarland foi preparada. Após homogeneização, a suspensão foi semeada em placa de ágar Müller-Hinton utilizando swab estéril. Para a técnica da disco-aproximação, foram dispensados os discos de aztreonam (30µg), ceftriaxona (30µg), ceftazidima (30µg) e cefepima (30µg) a uma distância de 30 mm (centro a centro) de um disco de amoxicilina/ácido clavulânico (30µg/10µg), que foi colocado no centro da placa. Os discos utilizados foram da Oxoid® (Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas de 18-24 horas, em temperatura de 35°C, sendo o teste da disco-aproximação considerado positivo para a produção de ESBL quando houve o aparecimento de deformações do halo de inibição ou o de uma zona fantasma entre o substrato e o inibidor. Para o controle de qualidade, foram incluídas nos testes de detecção fenotípica a cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603, produtora de ESBL, e a cepa de *E. coli* ATCC 25922, como controles negativos.

#### 4.9.3. Detecção genotípica para Carbapenemases e ESBL

A detecção dos genes de resistência foi realizada através da metodologia do PCR. A presença de beta-lactamases de espectro estendido foi avaliada por PCR direcionada aos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> e, para detectar carbapenemases, os genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, and *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub> (Tabela 4). Para realização da PCR foi utilizada uma solução de reação contendo GoTaq Green Master Mix 2X (Promega, Madison, USA), primers a 10 pmol, água estéril e DNA (~100 ng/µl). Todas as corridas de PCR foram realizadas usando controles positivos e água livre de RNase como controle negativo. As condições de PCR são descritas na Tabela 1S do manuscrito I.

#### 4.10. Análise de Dados

Os dados foram analisados através do programa estatístico *Statistical Package for the Social Sciences* versão 23.0 (IBM Brasil, SP, Brasil). A entrada de dados foi realizada pela investigadora (L.C.P.E.), e sob supervisão de uma investigadora sênior (A.P.V.C.).

Para a metodologia dos enterococos, os dados clínicos e demográficos, bem como a frequência de detecção de enterococos, fatores de virulência, susceptibilidade antimicrobiana

foram calculadas para cada indivíduos e, em seguida, calculada a média para cada grupo clínico. A prevalência de microrganismos subgingival foi determinada através da técnica do *Cherckerboard*, sendo calculada a média por paciente e por grupos. As diferenças entre os grupos em relação a todos os parâmetros analisados foram realizadas pelos testes do Qui-quadrado, Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. As associações entre a detecção de enterococos, fatores de virulência, susceptibilidade antimicrobiana e a prevalência da microbiota subgingival realizadas pelos testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado de 5%.

Já para os isolados de bacilos Gram-negativos, os parâmetros clínicos e demográficos também foram calculados para cada indivíduo e, em seguida, para cada grupo clínico periodontal. A frequência de BGN, bem como de cepas resistentes a um ou mais antimicrobianos foi calculada para cada grupo clínico. As diferenças para todos os parâmetros entre os grupos foram analisadas pelos testes de Qui-quadrado, teste exato de Fisher e Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 5. MANUSCRITO I

### **Prevalence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacilli in subgingival biofilm associated with periodontal diseases**

#### **Running title: Gram-negative bacilli in periodontitis**

Laís Christina Pontes Espíndola\*†, Renata Cristina Picão†, Stella Maria Casas Novas Mançano†, Renata Martins do Souto†, Ana Paula Vieira Colombo\*†

\*School of Dentistry, Department of Clinics, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

†Institute of Microbiology, Department of Medical Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

#### **Corresponding authors:**

Dr. Ana Paula V. Colombo

UFRJ/CCS - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Bloco I, lab. I2-03; Av. Carlos Chagas Filho, 373 Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ, Brasil - CEP: 21941-902

Email: [apcolombo@micro.ufrj.br](mailto:apcolombo@micro.ufrj.br)

Prof. Renata Martins do Souto

UFRJ/CCS - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Bloco I, lab. I2-03; Av. Carlos Chagas Filho, 373 Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ, Brasil - CEP: 21941-902

Email: [renata.souto@micro.ufrj.br](mailto:renata.souto@micro.ufrj.br)

Word Count: 3797

Numbers of figures: 3

Numbers of tables: 1 (supplemental 2)

Numbers of references: 50

Keyword: Periodontal disease; Gram-negative bacilli; antimicrobial resistance; ESBL, carbapenemases.

**One-Sentence Summary:** Prevalence and antimicrobial susceptibility of gram-negative bacilli in subgingival biofilm associated with periodontal diseases

## Abstract

**Background:** This study aimed to determine the prevalence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacilli (GNB) isolated from subgingival biofilm of individuals with different periodontal conditions.

**Methods:** Subgingival biofilm was obtained from 362 individuals with periodontal health (PH, n=81), gingivitis (G, n=74) and periodontitis (P, n=207), cultivated in broth and selective media (MacConkey agar). GNB were isolated and identified by MALDI-ToF. Antimicrobial susceptibility was determined by CLSI disk diffusion. Production of ESBL and carbapenemases were evaluated by double disk synergy test and spectrophotometric detection of imipenem hydrolysis, respectively, and ESBL and carbapenemase encoding genes were surveyed by PCR. Differences among groups were examined by Chi-square, Kruskal-Wallis or Mann-Whitney tests.

**Results:** GNB were isolated from 36.2% of all samples, with a significantly greater prevalence ( $p < 0.001$ ) in P patients (46.4%) compared to PH (22.2%) and G (22.9%). *Pseudomonas aeruginosa* (27.5%), *Enterobacter cloacae* (16.8%) and *Enterobacter asburiae* (10.7%) were the most predominant species. Resistance/reduced sensitivity to  $\geq 1$  antimicrobial was found in 60% of GNB from all groups, whereas only 4.6% were multidrug resistant. High resistance rates were seen in the *Enterobacteriaceae* family for cefoxitin (50.9%), cephalotin (49.1%), amoxicillin-clavulanate (47.3%) and cefazolin (42.9%). One strain of *K. pneumoniae* showed resistance/reduced sensitivity to imipenem, although the ESBL-phenotype and PCR targeting beta-lactamase encoding genes were negative.

**Conclusion:** High frequency of antimicrobial resistance/intermediate sensitivity was observed in GNB isolated from periodontitis-related subgingival microbiota. The subgingival biofilm may be a source of opportunistic resistant GNB, which may hinder the response to periodontal therapy.



## 1 Introduction

Periodontal disease (PD) is characterized by a chronic inflammatory process resulting from a dysbiosis of the associated polymicrobial biofilm in a susceptible host that may lead to loss of periodontal attachment, alveolar bone destruction, and eventual tooth loss.<sup>1-4</sup> Although the dysbiotic periodontal pathogenic biofilm is the primary etiological factor, the disease is modulated by genetic, environmental and behavioral host-related factors in different individuals.<sup>3,5-6</sup> Periodontal diseases have also been shown to contribute to the development or aggravation of other systemic inflammatory conditions of the human organism.<sup>7-9</sup>

Interest has been increasing in the search for opportunistic pathogens in the oral cavity, especially biofilm-growing microorganisms present in the dental biofilm, which tend to be less susceptible to antimicrobials and the immune system.<sup>10</sup> These and other biofilm-related features in the oral cavity may lead to serious clinical implications, including the development of an oral focus of pathogens associated with systemic human infections, reinfection and therapeutic failure.<sup>9-10</sup>

Microbial species normally associated with infections in other parts of the human organism, as well as environmental species have been described in high proportions and levels in individuals and sites with periodontal diseases.<sup>10-13</sup> Thus, the oral cavity can in fact function as a reservoir for several pathogens of medical importance, including Gram-negative microorganisms, particularly of the *Enterobacteriaceae* family, which present a wide range of virulence factors and resistance to several antimicrobials. Colonization by these species may be facilitated by or may contribute to a dysbiotic condition of the periodontal microbiota normally seen in patients with periodontal diseases.

Regardless of a possible role of these microorganisms in the etiopathogenesis of these diseases, this investigation aimed to assess the prevalence of gram-negative bacilli (GNB) in subgingival biofilm samples from patients with different periodontal conditions, to determine their antimicrobial susceptibility profile and address the occurrence of ESBL and carbapenemase producers.

## 2 Materials and methods

### 2.2 Ethical statement

This cross-sectional study was conducted in full accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013. The study protocol was approved by the Human Research Ethics Committee of the Clementino Fraga Filho Hospital of the Federal University

of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil (CAEE: 31911214.0.0000.5257). To participate, individuals were informed about the risks and benefits of the study and signed an informed consent form.

### **2.3 Sample population**

Participants were recruited from the Division of Graduate Periodontics of the School of Dentistry at UFRJ, between November/2017 and December/2019. Subjects had to be  $\geq 18$  years-old and present at least 18 teeth. Exclusion criteria included presence of chronic inflammatory systemic diseases, use of topical or systemic antimicrobials in the last 6 months, use of anti-inflammatory drugs in the last 3 months, periodontal therapy in the last 6 months, need for antibiotic prophylaxis, orthodontic treatment, pregnancy or nursing. Eligible individuals were clinically examined and diagnosed as presenting periodontal health (PH), gingivitis (G) or periodontitis (P), according to the current classification with modifications.<sup>14</sup>

### **2.4 Study outcome and sample size**

The primary outcome variable was the prevalence of GNB in the subgingival biofilm of individuals with periodontal health or disease. The sample size calculation took into consideration an estimated alpha error of 5%, 85% of power, a 2:1 case/control ratio to detect a 15% difference in prevalence of GNB between periodontal diseases (G and P) and PH. Assuming a possible loss of 10%, a total of 169 individuals in the periodontal diseases group and 81 in the health group were estimated.

### **2.3 Clinical examination**

At the first visit, patients were evaluated regarding demographic, medical and dental health history by questionnaires. Periodontal clinical measurements were performed by a single calibrated examiner (L.C.P.E.) using a North Carolina probe\*. Calibration was carried out in 20 patients with PH, G and P who were not included in the study. Pairs of examinations were conducted in each individual within 1-week interval between them. Intra-class correlation coefficients for probing depth (PD) and clinical attachment level (CAL) were 0.90 and 0.92, respectively. The periodontal parameters evaluated included PD and CAL (mm), and presence of supragingival biofilm (SB), bleeding on probing (BOP), gingival inflammation (GI), calculus index (CA) and suppuration (SUP), at 6 sites per tooth of all teeth, except third molars. All individuals with G and P and other dental needs were referred for treatment at the Department of Dental Clinic of the School of Dentistry of UFRJ.

## 2.4 Subgingival biofilm sampling

For each patient, after removal of supragingival plaque, subgingival biofilm samples were taken with sterile curettes<sup>†</sup> from 8 periodontal sites (2 sites per quadrant, 1 posterior and 1 anterior tooth), pooled into cryogenic tubes containing Mycoplasma broth<sup>‡</sup> with 5% Dimethyl sulfoxide (DMSO)<sup>§</sup>, and immediately transported to the laboratory for processing. Samples from 8 healthy sites were obtained from PH patients, 8 sites with gingival bleeding from G patients, and 8 sites with the deepest periodontal pockets from P patients.

## 2.5 Isolation and identification of Gram-negative bacilli

For isolation and cultivation of GNB, subgingival biofilm samples stored in tubes with Mycoplasma broth<sup>‡</sup> and 5% DMSO<sup>§</sup> were vigorously mixed and then inoculated into Gram-negative broth<sup>||</sup>, Brain Heart Infusion broth (BHI)<sup>¶</sup>, and BHI broth<sup>¶</sup> with Ceftriaxone<sup>#</sup>, at 37°C for 48h. Cultures with microbial growth were subsequently plated on MacConkey Agar\*\* medium and incubated at 37°C for 48h. Colonies grown on plates were isolated, checked for purity, cell morphology and Gram staining, transferred to pure culture and then identified by matrix assisted laser desorption mass spectrometry<sup>††</sup>.

## 2.6 Antimicrobial susceptibility analysis

Antimicrobial susceptibility profile was assessed by disk diffusion according to the Clinical and Laboratory Standards Institute recommendations.<sup>15</sup> Isolated strains were initially seeded on Trypticase Soy Agar<sup>‡‡</sup> plates for 18-24h at 35°C. Bacterial suspension were prepared in 0.85% saline solution to reach 0.5 McFarland turbidity standard (~ 10<sup>8</sup> CFU / mL) and inoculated onto Müeller-Hinton agar<sup>§§</sup> plates to achieve confluent growth. The antibiotic discs were deposited on the inoculated plates and the inhibition zones read after 16-18h of incubation at 35 °C. For *Enterobacteriaceae*, antimicrobials tested included ampicillin (10µg), amoxicillin-clavulanate(20/10µg), ceftazidime (30µg), cefepime (30µg), cefuroxime (30µg), ceftriaxone (30µg), cefepime (30µg), amikacin (30µg), gentamicin (10µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75µg), ciprofloxacin (5µg) and imipenem (10µg)<sup>|||</sup>. For *P. aeruginosa*, the antimicrobials piperacillin-tazobactam (100/10 µg), ceftazidime (30µg), cefepime (30µg), imipenem (10µg), aztreonam (30µg), gentamicin (10µg), tobramycin (10µg), amikacin (30µg), and ciprofloxacin (5µg)<sup>||||</sup> were tested, whereas *Acinetobacter* species were tested for susceptibility against ampicillin-sulbactam (100/10 µg), piperacillin-tazobactam (100/10 µg), ceftazidime (30µg), cefepime (30µg), ceftriaxone (30µg), imipenem (10µg), gentamicin (10µg), tobramycin (10µg), amikacin (30µg), doxycycline (30µg), minocycline

(30µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75µg), and ciprofloxacin (5µg).<sup>111</sup> Strains identified as *Stenotrophomonas maltophilia* were tested for trimetoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75µg), levofloxacin (5µg), minocycline (30µg).<sup>111</sup> *E.coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were tested as controls.

## 2.7 Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase producers (ESBL)

The phenotypic production of ESBL was assessed by the double disk synergy test.<sup>16</sup> A bacterial suspension with turbidity corresponding to the 0.5 McFarland turbidity standard was prepared, and after homogenization, the suspension was seeded on two Müller-Hinton agar<sup>88</sup> plates. Aztreonam (30µg), ceftriaxone (30µg), ceftazidime (30µg) and cefepime (30µg) discs were placed at a distance of 30 mm (centre-to-centre) from an amoxicillin/clavulanate disc (30µg/10µg)<sup>111</sup>. The plates were incubated for 18-24 h, at 35°C, and the test was considered positive for ESBL production when there were deformations of the inhibition zone or a phantom zone between the substrate and the inhibitor. For quality control, the ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and *E. coli* ATCC 25922 were included as positive and negative controls, respectively. ESBL encoding genes were investigated by PCR targeting the *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*GES, and *bla*CTX-M1, -M8, -M9. PCR was performed in a 20 µl reaction solution containing GoTaq Green Master Mix 1x<sup>111</sup>, 10 pmol of each primer, sterile water, and the strain DNA (~100 ng/µl). All the PCR runs were performed using positive controls and RNase-free water as negative control. The PCR protocols are described in supplemental Table S1.

## 2.8 Phenotypic and genotypic detection of carbapenemase production

Ultraviolet-visible (UV–VIS) spectrophotometry was used to assess the hydrolytic activity of carbapenemases among isolates showing decreased susceptibility or resistance to imipenem. The absorption spectrum of imipenem in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.0, was examined within a wavelength of 297 nm.<sup>17</sup> In the pre-analytical phase, 500 µl of PBS was added to a microtube, and a robust amount of bacteria inoculated with the aid of a sterile disposable loop. The material was sonicated with five pulses of 5 seconds, with five second-interval between them. Subsequently, the suspension was centrifuged at 8,120 x g for 5 minutes, and the supernatant recovered. The analytical phase consisted of adding 50 µl of the bacterial suspension into 800 µl of a solution of PBS containing imipenem (200µg/ml). The

tested strains hydrolytic activity was measured according to the decrease in imipenem absorbance by spectrophotometry reading.

Isolates showing consistent decrease were considered positive for carbapenemase production and were submitted to PCR targeting the carbapenemase-encoding genes *blaIMP*, *blaVIM*, *blaSIM*, *blaGIM*, and *blaSPM*, *blaKPC*, *blaGES*, *blaNDM-1* and *blaOXA-48*<sup>18,19</sup> (Table S1), as described above.

## 2.9 Statistical analysis

Statistical tests of the data were performed with the Statistical Package for the Social Sciences 21.0<sup>\*\*\*</sup>. Data entry was carried out by one investigator (L.C.P.E.), and error proofed by a senior investigator (A. P. V.C.). Clinical and demographic parameters were computed for each individual, and then within each group. Frequency of detection of different species of GNB, as well as of resistant strains to one or more antimicrobial was calculated for each clinical group. Differences for all these parameters among groups were sought by Chi-square, Fisher's exact and Kruskal-Wallis tests. The level of significance was set at 5%.

## 3 Results

### 3.1 Study population characteristics

The flow chart of the study population is presented in Figure 1. Out of 544 screened patients, 362 were eligible for the study based on the selection criteria. These patients were clinically evaluated and their periodontal clinical status classified into major groups: PH (n = 81); G (n = 74) and P (n = 207).<sup>3</sup>

Demographic and clinical data of 362 individuals of the study population who were positive or negative for GNB are presented in Table 1. Overall, P patients presented more periodontal destruction and inflammation, as well as greater proportion of older individuals, African-Americans, and individuals with lower social-economic level than patients in the other groups (Chi-square and Kruskal-Wallis tests,  $p < 0.05$ ). When comparing GNB+ and GNB- individuals with the same periodontal status, gingivitis GNB+ patients presented significantly higher income and less sites with bleeding than GNB- gingivitis individuals. Moreover, PH GNB+ individuals presented more supragingival plaque than PH GNB- individuals (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ). No significant differences regarding mean % of sites with suppuration were detected among clinical groups who were positive for GNB; however, in the groups with samples negative for GNB, a higher prevalence of former smokers and sites with SUP were observed in the P group compared to the PH and G groups (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ).

### 3.2 High prevalence of GNB species in periodontitis-associated subgingival biofilm

A total of 131 strains isolated from 362 subgingival biofilm samples (36.2%) were positive for GNB after cultivation in selective media. Figure 2 shows the relative frequency distribution of all 131 isolates at the family (6), genus (13) and species (25) levels. Of the three predominant genera (*Enterobacter* - 32.1%; *Pseudomonas* - 29.8%; and *Klebsiella* - 14.5%), the most prevalent species were *P. aeruginosa* (26.9%), *Enterobacter cloacae* (16.9%), *Enterobacter asburiae* (10.8%), and *K. pneumoniae* (8.5%).

Regarding the distribution of GNB among clinical groups, a significantly higher number of GNB was isolated from subgingival biofilm samples of P patients (46.4%) compared to PH (22.2%) and G (22.9%) individuals (Fig. 3). Moreover, 73.3% of the 131 GNB strains were isolated from periodontitis samples (Chi-square,  $p < 0.001$ ). Nevertheless, no significant differences (Chi-square,  $p > 0.05$ ) in the prevalence of GNB species among clinical groups were observed (Figure 3). One can note that the P group presented more diversity of species than the other groups. Five isolates identified as *Cupriavidus pauculos* and four as *S. maltophilia* were exclusively found in P subgingival biofilm samples (Fig. 3).

In order to correlate GNB species with demographic and clinical parameters of disease in all individuals and within each clinical group, continuous variables were dichotomized into values corresponding to  $\leq$  median or  $>$  median of each parameter. Strains of the most predominant families, *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*, were isolated significantly more often from women and individuals with high educational level (Chi-square,  $p < 0.05$ ), in particular the species *E. asburiae*, *E. cloacae* and *P. aeruginosa*, in the P group ( $p < 0.01$ ). In contrast, *E. cloacae* and *P. aeruginosa* were more frequently isolated from non-smokers and younger individuals ( $\leq 43$  years of age) with PH ( $p < 0.05$ ). No associations between the frequency of any of the 25 GNB species identified and dichotomic periodontal clinical parameters were observed (data not shown).

### 3.3 Antimicrobial susceptibility of GNB from subgingival biofilm

Of the 131 GNB strains isolated and identified, 86 were recovered for antibiogram testing. Over 97% of these isolates belonging to the families *Enterobacteriaceae* (genera *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus* and *Pantoea*), *Pseudomonadaceae* (genus *Pseudomonas*), *Moraxellaceae* (genus *Acinetobacter*) were susceptible to the antibiotics amikacin, gentamicin, ceftazidime, cefepime, ciprofloxacin and imipenem. For 55 isolates of the *Enterobacteriaceae* family, higher resistance rates were

observed for cefoxitin (50.9%), amoxicillin-clavulanate (47.3%) and cefazolin (42.9%). The predominant species resistant to these antimicrobials were *Serratia marcescens*, *E. cloacae* and *Enterobacter kobei*. In contrast, other *Enterobacteriaceae* species such as *E. coli*, *Proteus mirabilis* and *Pantoea dispersa* were susceptible to all antimicrobials tested, as well as *S. maltophilia*. Out of the 86 strains tested, 60.5% presented resistance and/or intermediary susceptibility to at least one antimicrobial, whereas only 4.6% were multidrug resistant, including two strains of *E. cloacae*, one *K. pneumoniae* and one *K. oxytoca* (supplemental Table S2).

Comparisons of the frequency of resistant strains among periodontal groups showed no significant differences for all antimicrobials tested, except for ceftriaxone which presented higher resistance rates for strains isolated from PH individuals (3/7) compared to strains from G (1/9) and P patients (1/40) (Chi square test,  $p = 0.014$ ; data not shown). The overall resistance rate for this cephalosporin of third generation was 8.9% (Table S2).

### **3.4 Reduced sensitivity to carbapenems, but no detection of ESBL and carbapenemase-encoding genes**

Only one strain of *K. pneumoniae* isolated from periodontitis showed reduced susceptibility to imipenem measured by hydrolytic activity. This strain was also resistant to imipenem by the disc diffusion test. However, this strain did not carry any of the ESBL or carbapenemase-encoding genes surveyed. (supplemental Table S2).

## **4 Discussion**

Although there is now a more general consensus that the oral cavity, in particular the dental biofilm, provides a reservoir for the establishment a wide range of non-oral pathogenic microorganisms, they are still considered merely transient organisms<sup>20,21</sup>, which role in the oral microbiome and diseases remains unclear.<sup>22-24</sup> GNB of the *Enterobacteriaceae* family, for instance, are common members of the human gut microbiome, implicated in several infectious diseases. They are known to present a large arsenal of virulence factors and resistance to multiple antimicrobials. In addition, they are able to integrate and interact with oral species within the dental biofilm, presenting a potential source of horizontal dissemination of multidrug resistance genes to the oral community.<sup>25</sup> Worldwide epidemiological research reports different rates of prevalence of these organisms in the oral cavity of healthy individuals.<sup>20-24,26-31</sup> However, limited data on the frequency of detection of these species in the dysbiotic subgingival biofilm associated with periodontitis are available. Therefore, this investigation

focused on determining the carriage and identification of GNB in the subgingival biofilm of individuals with periodontal health and diseases, and more importantly, on analyzing the level of susceptibility of these strains to various antimicrobials.

An overall prevalence of 36.2% of GNB was observed, with a significantly increased frequency in subgingival biofilm samples associated with periodontitis (46.4%), corroborating data reported in other studies.<sup>21-23,32-33</sup> Nevertheless, the detection of these microorganisms in the oral cavity and/or periodontal pockets seems to vary widely among studies with different populations, severity of disease, sampling techniques, methods of identification and analysis.<sup>22, 24,32</sup> Detection rates from 14% in North Americans with periodontitis<sup>33</sup> to 60-90% in periodontitis individuals from Romania<sup>34</sup>, Sudan<sup>35</sup> and India<sup>36</sup> have been reported. The high prevalence in certain locations can be attributed to contamination of drinking water or food, inefficient oral hygiene, limited access to oral health care, differences in microbiome composition from distinct geographic areas<sup>34-36</sup>, host immunosuppression, as well as to massive or uncontrolled utilization of antimicrobials that may lead to the overgrowth of multidrug resistant organisms in the subgingival microenvironment.<sup>34</sup>

Despite the fact that GNB and other opportunistic microorganisms may be transient members in the oral cavity, the persistence of a dysbiotic biofilm associated with periodontal diseases may favor a long-term colonization by these pathogens, which may directly or indirectly contribute to periodontal inflammation and tissue destruction.<sup>22-24,37</sup> In fact, synergistic relationships between non-oral pathogens and oral/periodontal species within the biofilm have been reported.<sup>22-24,37</sup> Ardila et al.<sup>22</sup> showed the synergic relationship between *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) and *P. aeruginosa*. Moreover, *P. aeruginosa* was strongly correlated with PD and CAL > 5 mm, as well as periodontal pockets harboring Gram-negative rods correlated with detection of *Aa*, *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*.

A greater diversity of GNB species were identified in the periodontitis samples, but no significant differences among groups were seen. *P. aeruginosa* (27.5%), *E. cloacae* (16.8%), *E. asburiae* (10.7%) and *K. pneumoniae* (8.4%) were the most common species identified among the GNB isolates, supporting the findings of other authors.<sup>24,25,34</sup> Although microbial culture was the method here used, our group found similar frequencies for *P. aeruginosa* (30-50%) and *K. pneumoniae* (8-12%) in subgingival biofilm by utilizing different molecular identification methods, such as whole genomic DNA-probes and checkerboard<sup>34</sup>, PCR<sup>32</sup>, and microarray.<sup>31</sup> *P. aeruginosa* is a major opportunistic pathogen associated with systemic infections in immune-compromised and hospitalized patients, as well as individuals with



chronic obstructive pulmonary diseases and cystic fibrosis.<sup>32,38, 39</sup> Its ability to form biofilm, on biotic (lungs) and abiotic surfaces (endotracheal tubes, catheters), makes this species resistant to the host immune response and antimicrobial therapies, being that the principal cause of mortality in those patients.<sup>40, 41</sup> In the oral cavity, it may interact with other oral pathogens and colonize the dental biofilm,<sup>11</sup> increasing the risk of spreading to the respiratory tract and blood stream in immune-deficient and hospitalized individuals.<sup>40</sup>

This scenario becomes even more life threatening because many of these microorganisms carry multiple genes of resistance that can be easily exchanged among distinct species within the dental biofilm. Our findings showed that around 60% of the GNB isolates from all clinical groups, tested for susceptibility, showed resistance or reduced susceptibility to one or more antimicrobials. Most of them are members of the *Enterobacteriaceae* family, resistant to cephalosporins of first and second generations, as well as amoxicillin-clavulanate. The predominant species resistant to these antimicrobials were *Serratia marcescens*, *E. cloacae* and *Enterobacter kobei*, species intrinsically producers of cephalosporinases. All strains were susceptible to amikacin and gentamicin, and only one strain of *K. pneumoniae* isolated from periodontitis was resistant to ciprofloxacin and imipenem. Similar findings were reported by several authors investigating these species in samples of the Brazilian population from different regions of the country. Gaetti-Jardim et al.<sup>41</sup> analyzed saliva, dental plaque and mucosal samples from individuals with various periodontal conditions and edentulous. Most of the enteric rods resistant to amoxicillin-clavulanate (42%) and cephalotin (34%) were producers of beta-lactamases, and low resistance to amikacin, gentamicin, ciprofloxacin and imipenem was reported. Barbosa et al.<sup>23</sup> also identified a high susceptibility to ciprofloxacin, but a much higher resistance rate to amoxicillin-clavulanate (70%) in enteric rods, pseudomonas and *Acinetobacter* spp. from periodontitis lesions. In another study, resistance to amoxicillin-clavulanate (57.8%) and cefoxitin (45.3%), as well as high level of multidrug resistance (48%) in *Enterobacteriaceae* isolates from the oral cavity of healthcare staff and workers of a hospital was observed. Likewise, Gonçalves et al.<sup>24</sup> identified high levels of resistance to amoxicillin-clavulonate (81%) and multidrug resistance of enteric rods (50%) isolated from periodontal pockets. However, the prevalence of *Enterobacteriaceae* isolates in this study was low (20%). Of interest, the authors showed that several of the isolates presented activity of hydrolytic enzymes, such as gelatinase, lecithinase, caseinase, elastase, i.e., proteases involved in periodontal tissue destruction that could contribute to disease pathogenesis.

In contrast to these studies, we found a low prevalence (4.6%) of multi-drug resistance. It is noteworthy to mention that the few multidrug resistant strains were isolated from patients

with medical history of hospitalization and/or antimicrobial therapy in the last 6 months. Only one strain of *K. pneumoniae* resistant to carbapenem (imipenem) was detected/ however, it did not carry any of the ESBL and carbapenemases encoding genes surveyed, supporting data by Leão-Vasconcelos and co-workers<sup>42</sup>. In a pilot study, the presence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in plaque samples of healthy individuals who were fecal carriers of these bacteria was an uncommon finding. Conversely, other authors have reported high numbers of oral and non-oral GNB producers of various  $\beta$ -lactamases and carriers of several  $\beta$ -lactam resistance genes in the oral cavity.<sup>42-45</sup>

Discrepant findings between phenotypic and genotypic susceptibility analyses may be due to several factors, including the existence of different mechanisms of resistance.<sup>46-48</sup> Other mechanisms such as hyper-production of AmpC  $\beta$ -lactamase in combination with loss or mutation of major outer membrane porins may account for carbapenem resistance.<sup>47,48</sup>

Despite the non-detection of genes to ESBL and carbapenemases, the high resistant rate of *Enterobacteriaceae* species to penicillins and cephalosporins in the subgingival plaque has major clinical implications. These drugs are amongst the most prescribed antibiotics in dentistry.<sup>49</sup> Thus, selective pressure of routinely administered  $\beta$ -lactams may increase the proportion of these cephalosporinase producer GNB in dental plaque, independent of genetic acquisition of resistance. Compared to the overuse of broad-spectrum antimicrobials in hospital settings, veterinary medicine, agriculture and animal husbandry,<sup>49,50</sup> the contribution of dental medicine to global antibiotic resistance is still limited. Nevertheless, recent data have shown that 80% of antibiotics prescribed for infectious endocarditis prophylaxis before dental procedures, usually broad-spectrum  $\beta$ -lactams, are unnecessary.<sup>49, 50</sup>

Individuals carrying these species in the oral cavity can become true sources of infection and reinfection for themselves in other parts of the organism, other individuals and the environment. Systemic spreading of microorganisms from the mouth can be even more evident in patients with poor oral hygiene, hospitalized and immunosuppressed.<sup>40</sup> Therefore, preventive and therapeutic measures for controlling periodontitis-related subgingival biofilm must be routinely implemented in order to eliminate possible infectious foci with resistant microorganisms, and consequently, their potential dissemination and onset of systemic illness.

## 5. Conclusion

A relatively high prevalence of Gram-negative bacilli was observed in the subgingival microbiota of patients with periodontitis. Increased levels of resistance to antimicrobials commonly used in dentistry may hinder the treatment and control of periodontal diseases, and

can be a potential source for dissemination to distant body sites, increasing the risk for serious infectious systemic infections.

### Footnotes

\*UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

†Gracey curets, scaler Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

‡ Mycoplasma broth, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil

§ DMSO, Sigma-Aldrich

|| Gram-negative broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA

¶ Brain heart infusion broth, Becton, Dickinson and Company

# Ceftriaxone, Diagnósticos Microbiológicos Especializados, Araçatuba, SP, Brazil

\*\* MacConkey agar, Plastlabor, Inhaúma, RJ, Brazil

†† MALDI-ToF; Bruker Daltonics®, Billerica, MA, USA

‡‡ Trypticase Soy Agar, Becton, Dickinson and Company

§§ Mueller-Hinton agar, Becton, Dickinson and Company

||| Antibiotic discs, Cecon, São Paulo, SP, Brazil

¶¶ Oxoid Brasil, Pinheiros, SP, Brazil

## GoTaq Green Master Mix 2x, Promega, Madison, USA

\*\*\* SPSS, IBM Brazil, SP, Brazil

### Authors Contribution:

A.P.V.C. and R.M.S.: conception and design; analysis and interpretation of data; drafting the article; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

L.C.P.E.: conception and design; execution of clinical and laboratorial experiments; analysis and interpretation of data; drafting the article; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

R.C.P.: design of assays for antimicrobial susceptibility analysis, final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved,

S.M.C.N.M.: execution of laboratorial experiments of antimicrobial susceptibility and data analysis, final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

### **Acknowledgments**

This study was supported in part by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brasilia, Brazil; Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Rio de Janeiro, Brazil. The authors appreciate the collaboration of all individuals who participate of this study.

**Conflict of Interest:** Authors declare no conflict of interest.

### **References**

- 1- Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS, Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontol 2000* 1997;14:216–248.
- 2- Hajishengallis G, Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* 2012; 27(6):409–419.
- 3- Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol 2000* 2015; 69(1):7-17.
- 4- Papapanou PN, Susin C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? *Periodontol 2000* 2017;75(1):45-51.
- 5- Holt SC, Ebersole JL. Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000* 2005;38:72-122.
- 6- Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontol 2000* 2005; 38:135-187.
- 7- Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A proposed model linking inflammation to obesity, diabetes, and periodontal infections. *J. Periodontol* 2005;76(11):2075–2084.

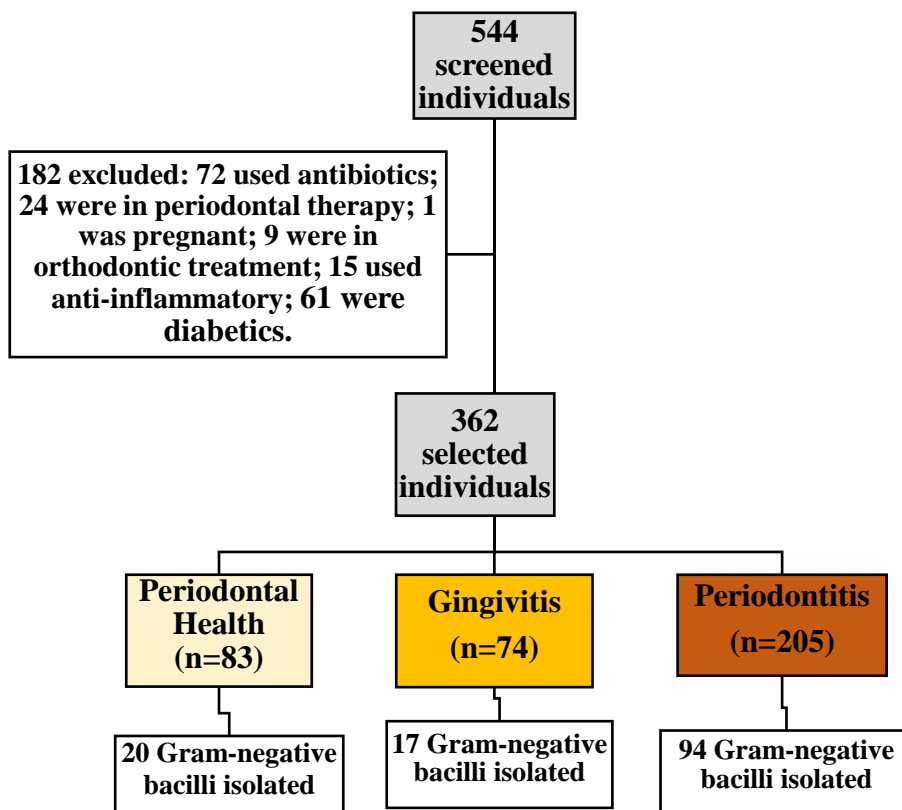
- 8- Beck JD, Slade G, Offenbacher S. Oral disease, cardiovascular disease and systemic inflammation. *Periodontol 2000* 2003; 23: 110–120.
- 9- Kumar PS. From focal sepsis to periodontal medicine: a century of exploring the role of the oral microbiome in systemic disease. *J Physiol* 2017;595(2):465–476.
- 10- Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity. *J. Med. Microbiol* 2001;50(11):940-946.
- 11- Kennedy HF, Morrison D, Kaufmann ME, et al. Origins of Staphylococcus epidermidis and Streptococcus oralis causing bacteraemia in a bone marrow transplant patient. *J. Med. Microbiol* 2000; 49 (4): 367-370.
- 12- Didilescu AC, Skaug N, Marica C, Didilescu C. Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases. *Clin. Oral Invest* 2005;9(3): 141-147.
- 13- Botero JE, Contreras A, Lafaurie G, Jaramillo A, Betancourt M, Arce R.M. Occurrence of periodontopathic and superinfecting bacteria in chronic and aggressive periodontitis subjects in a Colombian population. *J. Periodontol* 2007; 78(4):696-704.
- 14- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 2018;45(20):S1-S8.
- 15- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2018) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100 28th edition. Wayne, PA.
- 16- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended Broad-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer  $\beta$ -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns. *Reviews of Infectious Diseases* 1998;10(4)867-878.
- 17- Takeuchi D, Akeda Y, Sugawara Y, et al. Establishment of a dual-wavelength spectrophotometric method for analysing and detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Sci Rep* 2018;24;8(1):15689.
- 18- Paschoal RP, Campana EH, Corrêa LL, et al. Concentration and Variety of Carbapenemase Producers in Recreational Coastal Waters Showing Distinct Levels of Pollution. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(12): e01963-17.
- 19- Mançano SMC, Campana EH, Felix TP, Barrueto LRL, Pereira OS, Picão RM. Frequency and diversity of *Stenotrophomonas* spp. carrying *bla<sub>KPC</sub>* in recreational coastal Waters. *Water research* 2020;185: 116210.

- 20- Sedgley CM, Samaranayake LP, Chan JC, Wei SH. A 4-year longitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children. *Oral Microbiol Immunol* 1997;12:183-8.
- 21- Gamboa F, García DA, Acosta A, et al. Presence and antimicrobial profile of gram-negative facultative anaerobe rods in patients with chronic periodontitis and gingivitis. *Acta Odontol Latinoam* 2013; 26:24-30.
- 22- Ardila CM, Alzate J, Guzmán IC. Relationship between gram negative enteric rods, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and clinical parameters in periodontal disease. *J Indian Soc Periodontol* 2012; 16:65-9.
- 23- Barbosa FCB, Mayer MPA, Saba-Chujfi E, Cai S. Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonas from Brazilian periodontitis patients. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16:306–310.
- 24- Gonçalves MO, Coutinho-Filho WP, Pimenta FP, et al. Periodontal disease as reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species. *Lett Appl Microbiol* 2007;44: 488-94.
- 25- Thurnheer T, Belibasakis GN. Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms. *Virulence* 2015;6(3):258-64.
- 26- Sedgley CM, Samaranayake LP. Oral and oropharyngeal prevalence of *Enterobacteriaceae* in humans: A review. *J Oral Pathol Med* 1994; 23: 104-13.
- 27- Sedgley CM, Chu CS, Lo ECM, Samaranayake LP. The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in semi semi-recluse human vegetarians. *Arch Oral Biol* 1996; 41 (3): 307–309.
- 28- Zaura E, Keijsers BJ, Huse SM, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol* 2009; 9:259.
- 29- Lourenco TGB, Heller D, Silva-Boghossian CM, Cotton SL, Paster BJ, Colombo APV. Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients. *J Clin Periodontol* 2014;41(11): 1027-1036.
- 30- Souto R, Silva CM, Colombo APV. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Brazilian Journal of Microbiology* 2014; 45(2):495-501.
- 31- Colombo APV, Magalhães CB, Hartenbach FARR, Souto RM, Silva-Boghossian CM. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog* 2016; 94:27-34.

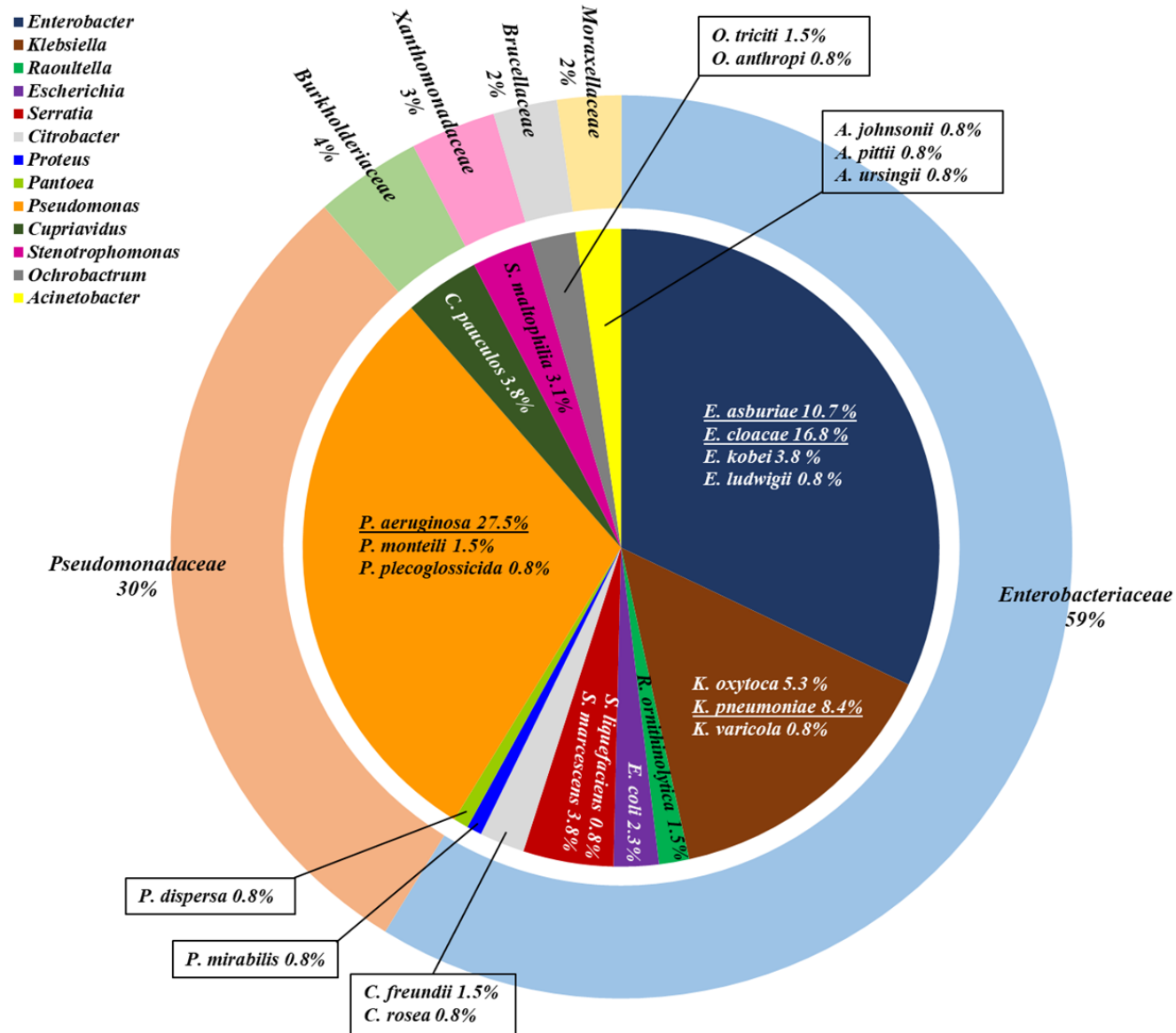
- 32- Slots J, Rams TE. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Acinetobacter* in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1990;5(3):149-154.
- 33- Ali RW, Velcescu C, Jivanescu MC, Lofthus B, Skaug N. Prevalence of six putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples From Romanian adult periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1996;23(2):133–139.
- 34- Ali RW, Bakken V, Nilsen R, Skaug N. Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients. *J Periodontol* 1994;65(11):1046–1052.
- 35- Ranganathan AT, Sarathy S, Chandran CR, Iyan K. Subgingival prevalence rate of enteric rods in subjects with periodontal health and disease. *J Indian Soc Periodontol* 2017;21(3):224-8.
- 36- Arirachakaran P, Luangworakhun S, Charalampakis G, Dahlén G. Non-oral, aerobic, Gram-negative bacilli in the oral cavity of Thai HIV-positive patients on HAART medication. *J Invest Clin Dent* 2019; e12387.
- 37- Da Silva-Boghossian CM, Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2011;56(9):899–906.
- 38- Scannapeccio FA, Bush RB, Paju S. Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review. *Ann Periodontol* 2003;8(1):54-69.
- 39- Ewan VC, Sails AD, Walls AWG, Rushton S, Newton JL. Dental and microbiological risk factors for hospital-acquired pneumonia in non-ventilated older patients. *PLoS ONE* 2015;10:e0123622.
- 40- Lam OL, McGrath C, Li LS, Samaranayake LP. Effectiveness of oral hygiene interventions against oral and oropharyngeal reservoirs of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative bacilli. *Am J Infect Control* 2012;40(2):175-182.
- 41- Gaetti-Jardim EC, Marqueti AC, Faverani LP, Gaetti-Jardim E Jr. Antimicrobial resistance of aerobes and facultative anaerobes isolated from the oral cavity. *Appl Oral Sci* 2010;18(6):551-9.
- 42- Leão-Vasconcelos LSNO, Lima ABM, et al. Enterobacteriaceae isolates from the oral cavity of workers in a Brazilian oncology hospital. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2015;57(2): 121-127.

- 43- Søråas A, Olsen I, Sundsfjord A, Handal T, Bjørang O, Jenum PA. Extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria are not detected in supragingival plaque samples from human fecal carriers of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Oral Microbiology* 2014; 6:1.
- 44- Dupin C, Tamanai-Shacoori Z, Ehrmann E, et al. Oral Gram-negative anaerobic bacilli as a reservoir of  $\beta$ -lactam resistance genes facilitating infections with multiresistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45(2):99-105.
- 45- Bratu S, Mooty M, Nichani S, et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(7):3018-3020.
- 46- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SS, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41:563– 569.
- 47- Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009;47(6):1631-1639.
- 48- Oberoi SS, Dhingra C, Sharma G, Sardana D. Antibiotics in dental practice: how justified are we. *Int Dent J* 2015;65: 4-10.
- 49- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health* 2015;109(7):309-318.
- 50- Holmes AH, Moore LSP, Sundsfjord A, et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet* 2016; 387(10014):176-187.

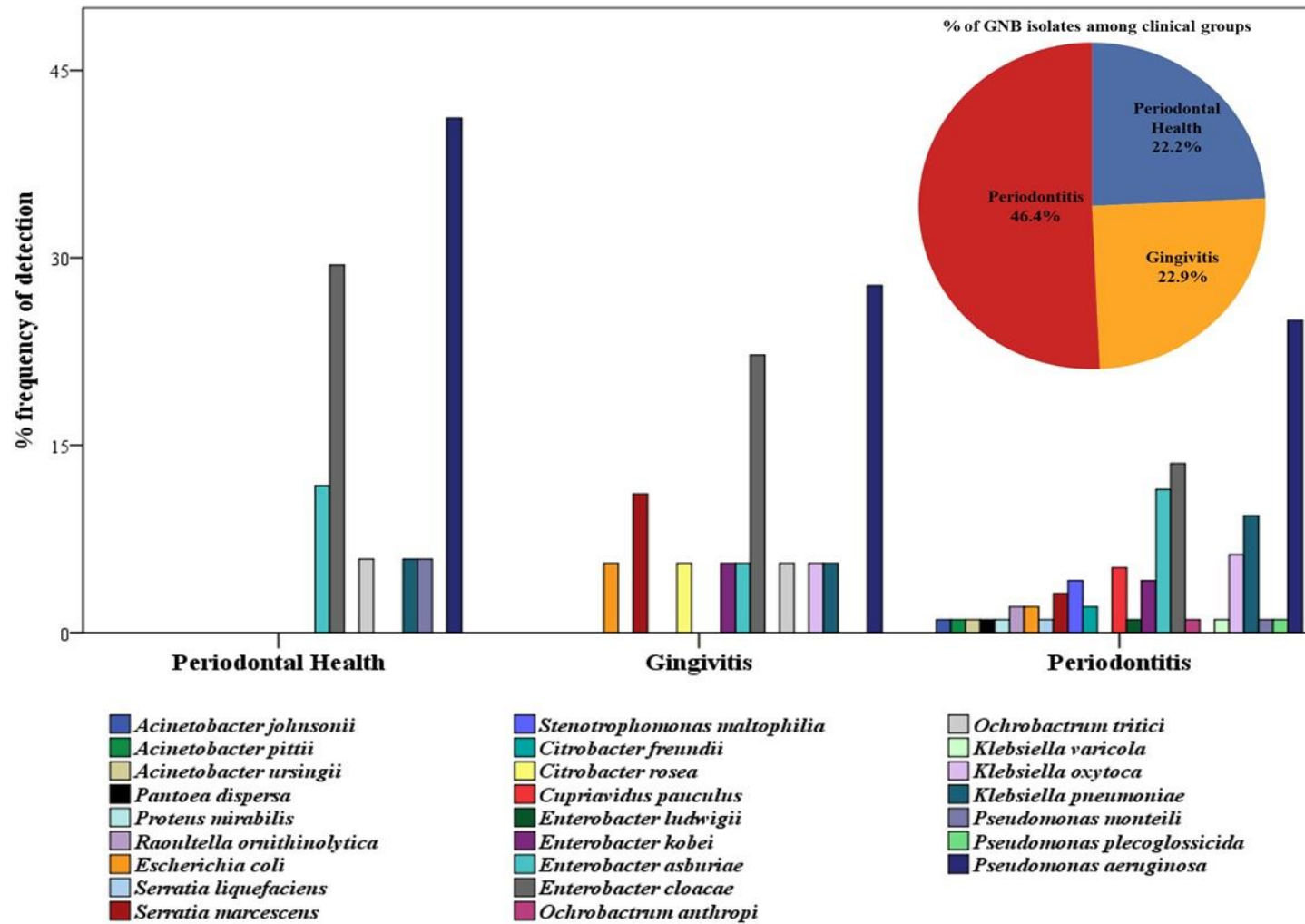




**Figure 1.** Flow chart of the enrollment of individuals in the study population. A total of 131 GNB strains were isolated of subgingival biofilm samples (36.2%) from 362 individuals tested.



**Figure 2.** Frequency of detection (%) of total Gram-negative bacilli isolated from 386 subgingival biofilm samples of 362 individuals, at family (outer circle), genus (inner pie) and species levels.



**Figure 3.** Frequency distribution of the 25 species identified of GNB isolated from subgingival samples of individuals with distinct periodontal status. The pie chart shows the significantly higher prevalence of GNB isolates from periodontitis subgingival biofilm samples compared to samples from gingivitis and periodontally healthy individuals (Chi-square,  $p < 0.001$ ). A greater diversity of species is seen in the periodontitis group, but no significant differences among clinical groups were detected (Chi-square,  $p > 0.05$ ).

**Table 1.** Demographic and clinical periodontal data of individuals of the study population who were culture-positive or negative for GNB.

Parameters	No isolation of GNB (n=257)			Isolation of GNB (n=105)		
	Periodontal Health (n=68)	Gingivitis (n=59)	Periodontitis (n=130)	Periodontal Health (n=13)	Gingivitis (n=15)	Periodontitis (n=77)
<b>Mean (SD) age in years*</b>	29.7 (11.4)	29.2 (11.6)	46.5 (12.6)	36.0 (17.5)	28.0 (14.3)	43.5 (13.2)
<b>Gender</b>						
% males	28.0	25.0	41.0	30.8	40.0	37.7
% females	72.0	75.0	59.0	69.2	60.0	62.3
<b>Race/Color*</b>						
% White	66.2	44.1	42.6	77.0	66.7	36.4
% African Americans	11.8	20.3	21.7	7.7	0	26.0
% Mestizos/Mulattos/Others	22.1	35.6	35.7	15.4	33.3	37.7
<b>% Household monthly income*</b>						
up to 1 minimum wage	10.3	16.9 <sup>†</sup>	26.0	0	26.7 <sup>†</sup>	30.7
up to 2 minimum wages	11.8	33.9 <sup>†</sup>	41.0	9.1	0 <sup>†</sup>	25.3
> 2 minimum wages	77.9	49.2 <sup>†</sup>	33.0	90.9	73.3 <sup>†</sup>	44.0
<b>% Education*</b>						
Middle School	0	1.7	18.1	0	0	17.1
High school	14.7	49.2	37.8	0	46.7	43.4
Higher education	85.3	49.2	44.1	100	43.4	39.5
<b>% Smoking<sup>‡</sup></b>						
Non-smokers	95.6	98.3	86.2	92.0	93.0	91.0
Former smokers	4.4	1.7	13.8	8.0	7.0	9.0
<b><i>Mean (SD) periodontal parameters</i></b>						
Number of missing teeth*	0.7 (1.2)	2.0 (3.5)	3.7 (3.5)	2.7 (3.8)	1.2 (2.5)	3.3 (3.0)
PD (mm)*	1.8 (0.4)	2.0 (0.3)	2.8 (0.9)	1.9 (0.2)	1.9 (0.2)	2.8 (0.9)
CAL (mm)*	1.9 (0.4)	2.0 (0.3)	3.2 (1.2)	2.0 (0.4)	1.9 (0.2)	3.1 (1.1)
% sites with BOP*	3.8 (2.9)	18.9 (10.7) <sup>†</sup>	35.6 (21.7)	5.4 (2.6)	15.5 (16) <sup>†</sup>	29.4 (17.7)

% sites with SB*	13.8 (11.5) <sup>§</sup>	35.4 (13.8)	46.8 (21.1)	27.1 (13.1) <sup>§</sup>	31.3 (15.1)	47 (20.7)
% sites with GI*	3.4 (3.4)	20.5 (8.9) <sup>†</sup>	25.1 (19.4)	3.3 (3.0)	17.2(13) <sup>†</sup>	22.7 (16.6)
% sites with CA*	5.2 (6.3)	7.7 (7.5)	23.8 (16.6)	14.7 (11)	9.2 (9.8)	23.3 (17.4)
% sites with SUP‡	0	0.03 (0.2)	0.60 (2.6)	0	0.05 (0.2)	0.33 (1.1)

GNB: gram-negative bacilli; PD: probing depth; CAL: clinical attachment level; BOP: bleeding on probing; SB: supragingival biofilm; GI: gingival bleeding; CA: calculus index; SUP: suppuration. \*Significant differences among periodontal clinical groups, positive or negative for GNB (Kruskal-Wallis test,  $p < 0.05$ ). †Significant differences between gingivitis individuals GNB+ and GNB- (Mann-Whitney test,  $p < 0.05$ ). ‡Significant differences among clinical groups GNB- (Kruskal-Wallis,  $p < 0.05$ ). §Significant differences between periodontal health individuals GNB+ and GNB-.

### Supplemental information

**Table S1.** Primers and amplification conditions for detection of ESBL (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M1</sub>*, *bla<sub>CTX-M8</sub>*, *bla<sub>CTX-M9</sub>*) and carbapenemases (*bla<sub>SPM</sub>*, *bla<sub>NDM-1</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>SIM</sub>*, *bla<sub>GIM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>GES</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*) target genes.

Target genes	Primer Sequence	Temperature conditions	Amplicon size (pb)
<i>bla<sub>VIM</sub></i> <sup>1</sup>	5'-GTTTGGTCGCATATCGCAAC-3' 5'-AATGCGCAGCACCAGGATAG-3'	94°C/5'; 35 cycles(94°C/20"; 53°C/45";72°C/30") and 72°C/10'	382
<i>bla<sub>SPM</sub></i> <sup>1</sup>	5'-CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG-3' 5'-CCTTTTCCGCGACCTTGATC-3'	94°C/5'; 35 cycles (94°C/20";53°C/45";72°C/30") and 72°C/10'	798
<i>bla<sub>GIM</sub></i> <sup>1</sup>	5'-TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC-3' 5'-CGGAACGACCATTGAATGG-3'	94°C/5'; 35 cycles (94°C/20"; 53°C/45";72°C/30") and 72°C/10'	72
<i>bla<sub>SIM</sub></i> <sup>1</sup>	5'-GTACAAGGGATTTCGGCATCG-3' 5'-TGGCCTGTTCCCATGTGAG-3'	94°C/5'; 35 cycles (94°C/20"; 53°C/45";72°C/30") and 72°C/10'	569
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i> <sup>2</sup>	5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3' 5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-3'	94°C/5'; 35 cycles (94°C/20"; 57°C/45"; 72°C/30") and 72°C/10'	743
<i>bla<sub>KPC</sub></i> <sup>3</sup>	5'-GCTACACCTAGCTCCACCTTC-3' 5'-TGGAGGGCCAATAGATGATT-3'	94°C/5'; 35 cycles (94°C/20"; 57°C/45"; 72°C/30") and 72°C/10'	945
<i>bla<sub>NDM</sub></i> <sup>4</sup>	5'-GGTTTGGCGATCTGGTTT-3' 5'-CGGAATGGCTCATCAC GATC-3'	94°C/5'; 35 cycles (94°C/20"; 57°C/45"; 72°C/30") and 72°C/10'	621
<i>bla<sub>GES</sub></i> <sup>5</sup>	5'-ATGCGCTTCATTCACGCAC-3' 5'-CTATTTGTCCGTGCTCAGG-3'	94°C/5'; 35 cycles (94°C/20"; 57°C/45"; 72°C/30") and 72°C/10'	840
<i>bla<sub>IMP-1</sub></i> <sup>6</sup>	5'-TGAGCAAGTTATCTGTATTC-3' 5'-TTAGTTGCTTGGTTTTGATG-3'	94°C/3'; 35 cycles (94°C/1'; 55°C/1'; 72°C/1') and 2°C/7'	740
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub></i> <sup>7</sup>	5'-ATGTGCAGYACCAGTAA-3' 5'-CGCTGCCGGTTTTATCSCCC-3'	95°C/10'; 30 cycles (95°C/30"; 56°C/30"; 72°C/45") and 72°C/10'	512
<i>bla<sub>CTX-M-8</sub></i> <sup>8</sup>	5'-AACRCRCAGACGCTCTAC-3' 5'-TCGAGCCGGAASGTGTYAT-3'	95°C/10'; 30 cycles (95°C/30"; 56°C/30"; 72°C/45") and 72°C/10'	326
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub></i> <sup>7,9</sup>	5'-GGTGACAAAGAGARTGCAACGGAT-3' 5'-TTACAGCCCTTCGGCGATGA-3'	95°C/10'; 30 cycles (95°C/30"; 56°C/30"; 72°C/45") and 72°C/10'	876
<i>bla<sub>TEM</sub></i> <sup>10</sup>	5'-CCCTTATTCCCTTTYTTGCGG-3' 5'-AACCAGCCAGCCWGAAGG-3'	95°C/10'; 30 cycles de 95°C/30"; 56°C/30"; 72°C/45") and 72°C/10'	680
<i>bla<sub>SHV</sub></i> <sup>10</sup>	5'-CTTGACCGCTGGGAAACGG-3' 5'-AGCACGGAGCGGATCAACGG-3'	95°C/10'; 30 cycles de 95°C/30"; 56°C/30"; 72°C/45") and 72°C/10'	200
<i>bla<sub>GES</sub></i> <sup>7</sup>	5'-AGCAGCTCAGATCGGTGTTG-3' 5'-CCGTGCTCAGGATGAGTTG-3'	95°C/10'; 30 cycles de 95°C/30"; 56°C/30"; 72°C/45") and 72°C/10'	750

## References

- 1- Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007 45:544–547.
- 2- Poirel L, Potron A, Nordman P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2012; 67(7):1597–1606.
- 3- Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48, 4438–4440.
- 4- Poirel L, Lagrutta E, Taylor P, Pham J, Nordmann P. Emergence of Metallo- $\beta$ -Lactamase NDM-1-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Australia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* Oct 2010; 54 (11): 4914-4916.
- 5- Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:891–97.
- 6- Yan J, Hsueh PR, Ko WC, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001;45(8):2224-2228.
- 7- Cardoso JP. Contribuição da hiperexpressão do sistema de efluxo AdeABC e da hiperprodução de AmpC na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* produtores de OXA-23 no Brasil [Thesis]. São Paulo/SP – Brasil: Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP;2013.
- 8- Dallenne C, Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65(3):490–495.
- 9- Ma L, Ishii Y, Chang FY, Yamaguchi K, Ho M, Siu LK. CTX-M-14, a plasmid-mediated CTX-M type extended-spectrum beta-lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(6):1985-1988.
- 10- Vasconcelos NG, Queiroz JHFS, Silva KED, Vasconcelos PCP, Croda J, Simionatto S. Synergistic effects of *Cinnamomum cassia* L. essential oil in combination with polymyxin B against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *PLoS One* 2020;15(7):e0236505.





PH: periodontal health AMI: amikacin <sup>1</sup> first generation cephalosporin  
 G: gingivitis GE: gentamicin <sup>2</sup> second generation cephalosporin  
 P: periodontitis AMXCLA: amoxicillin-clavulonate <sup>3</sup> third generation cephalosporin  
 S: susceptible TRI/SUL: trimethoprim-sulfamethoxazole <sup>4</sup> fourth generation cephalosporin  
 R: resistant CIPRO: ciprofloxacin R/I  $\geq 1$ : Resistant or intermediate to at least 1 antimicrobial  
 I: intermediate IMI: imipenem LS/R to Carb: reduced sensitivity or resistance to carbapenems  
 NT: not tested PIP: piperacillin-tazobactam ESBL phenotype: production of Extended-spectrum beta-lactamase  
 +: presence AZTR: aztreonam  
 -: absence TOB: tobramycin  
 LEVO: levofloxacin  
 MINO: minocycline  
 MDR: multidrug resistance

## 6. MANUSCRITO II

**Antimicrobial susceptibility and virulence of *Enterococcus* spp. isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm.**

**Running title: Enterococci resistance and virulence in periodontitis**

Laís Christina Pontes Espíndola\*†‡, Marcus Vinícius Manhães Ribeiro do Nascimento\*†‡, Renata Martins do Souto†, Ana Paula Vieira Colombo\*†

\* School of Dentistry, Department of Clinics, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

† Institute of Microbiology, Department of Medical Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil.

‡ These authors contributed equally to this work.

### **Corresponding authors:**

Dr. Ana Paula V. Colombo

UFRJ/CCS - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Bloco I, lab. I2-03; Av. Carlos Chagas Filho, 373 Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ, Brasil - CEP: 21941-902

Email: [apcolombo@micro.ufrj.br](mailto:apcolombo@micro.ufrj.br)

Prof. Renata Martins do Souto

UFRJ/CCS - Instituto de Microbiologia Paulo de Góes - Bloco I, lab. I2-03; Av. Carlos Chagas Filho, 373 Cidade Universitária - Rio de Janeiro, RJ, Brasil - CEP: 21941-902

Email: [renata.souto@micro.ufrj.br](mailto:renata.souto@micro.ufrj.br)

Word Count: 3894

Numbers of figures: 3

Numbers of tables: 3 (supplemental 4)

Numbers of references: 49

**One-Sentence Summary:** Antimicrobial susceptibility and virulence of *Enterococcus* spp. isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm.

**Conflict of Interest:** Authors declare no conflict of interest.

**Authors Contributions:** A.P.V.C and R.M.S: conception and design; analysis and interpretation of data; drafting the article; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved

L.C.P.E.:conception and design; execution of clinical and laboratorial experiments; analysis and interpretation of data; drafting the article; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved;

M.V.M.R.N: execution of laboratorial experiments; analysis and interpretation of data; drafting the article; final approval of the version to be published; agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

## Abstract

**Background:** This study evaluated the prevalence, virulence and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the subgingival microbiota of patients with different periodontal conditions.

**Methods:** Subgingival biofilm was obtained from Periodontal health/PH (n=139), Gingivitis/G (n=103) and Periodontitis/P (n=305) individuals, cultivated on selective media, and grown colonies identified by MALDI-ToF. Antimicrobial sensitivity was determined by disk diffusion and virulence genes by PCR. The subgingival microbiota composition was determined by checkerboard. Differences among groups were assessed by Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and Chi-square tests.

**Results:** *Enterococcus* spp. were isolated from 7.4% of all samples; 53.7% were *E. faecalis*. Enterococci were more predominant in P (9.8%) and G (7.8%) samples than PH (2.2%;  $p < 0.05$ ), but with no differences among levels of disease severity. High rates of low susceptibility/resistance were seen for ciprofloxacin, erythromycin and rifampicin. Predominant virulence factors included *ace* (64.3%), *asa* (39.3%) and *esp* (35.7%). *F. nucleatum* was prevalent in microbiota of enterococci+ individuals; lower % of *D. pneumosintes* was found in patients carrying *bopD*+ enterococci. Oral streptococci were prevalent (>70%) in the microbiota of patients carrying enterococci susceptible to doxycycline ( $p < 0.05$ ), which are frequently *bopD*- and *esp*- ( $p < 0.01$ ).

**Conclusion:** *E. faecalis* is increased in P biofilm. These disease-related enterococci carry virulence genes and express resistance to antibiotics commonly used in dentistry. Specific subgingival taxa are associated with their prevalence and virulence. Subgingival enterococci may interact with species of the dysbiotic periodontitis biofilm, constituting a reservoir of virulence and resistance factors that contribute to tissue destruction, antibiotic resistance dissemination and poor response to periodontal therapy.

**Keyword:** Periodontitis; Antimicrobials; Microbiology; Periodontal-systemic disease interactions

## 1. Introduction

*Enterococci* are Gram-positive, acid-lactic, non-spore forming facultative cocci that are increasingly associated with nosocomial infections such as bacteremia, infective endocarditis, urinary tract infections, burn wounds, and indwelling foreign devices.<sup>1,2</sup> Since the alarming appearance of vancomycin-resistant enterococci worldwide, the World Health Organization listed these microorganisms as high priority resistant pathogens for the development of new antibiotics to prevent and treat more efficiently enterococcal infections.<sup>3</sup>

Enterococci are ubiquitous microorganisms that can be found in different environments and foods, and normally inhabit the gastrointestinal tract, oral cavity and vagina in humans.<sup>4-6</sup> The most frequently detected species are *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* and *Enterococcus hirae*. These commensal enterococci of the human microbiome are not typically pathogenic in healthy hosts; however, they can cause serious infections in susceptible individuals and/or in certain conditions.<sup>2</sup>

There is still a controversial debate whether *Enterococcus* spp. are true members of the oral microbiota or merely transient bacteria,<sup>7,8</sup> and whether they play any role in oral diseases such as caries, persistent endodontic infections, periodontitis, and peri-implantitis.<sup>9,10</sup> Enterococci are rarely found in the oral cavity of healthy subjects with a good oral hygiene.<sup>8,11,12</sup> In contrast, their high occurrence in cases of failed endodontic treatment, persistent periapical lesions, and refractory periodontitis has been supported by its abilities to invade dentinal tubules, to survive for a prolonged period under adverse environmental conditions, to tolerate several antimicrobials, to express numerous virulence factors<sup>13-17</sup> and more importantly, to form recalcitrant biofilms that may serve as reservoir for exchange of antibiotic resistance genes among different species.<sup>2,13-15,18-21</sup> Antagonistic and synergistic relationships between enterococci and other species in polymicrobial infections have also been reported.<sup>2,18-20,22</sup> Therefore, regardless of being a transitory oral organism, *Enterococcus* spp. may integrate the dental biofilm and contribute to the pathogenicity of oral diseases.

In individuals with periodontal diseases, the occurrence of *Enterococcus* spp. can reach high frequency rates, depending on the population, severity of disease and microbiological methodology applied.<sup>10,18,22-29</sup> Despite the unclear role of enterococci in the pathogenesis of periodontal diseases, these microorganisms possess several virulence factors that can contribute to periodontal inflammation and tissue destruction.<sup>6,11,15,23,29-31</sup>

High rates of antimicrobial resistance due to the presence of mobile genetic elements have also been reported in oral enterococci strains.<sup>30,32-34</sup>

Putting all together, *Enterococcus* spp. appear to adapt to the dysbiotic periodontitis-associated biofilm, possibly interacting with oral species and constituting a critical reservoir for transferable determinants of virulence and antibiotic resistance. Based on such premises, this study aimed to determine the frequency of detection, antimicrobial susceptibility and virulence factors of enterococci isolated from subgingival biofilm of individuals with different periodontal conditions. In addition, enterococci detection, antimicrobial susceptibility and virulence were associated with the subgingival microbiota taxa of these individuals.

## **2. Material and methods**

### **2.1 Study Population**

This cross-sectional study was conducted in full accordance with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2013, and was approved by the Human Research Ethics Committee of the Clementino Fraga Filho Hospital of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil (CAEE: 31911214.0.0000.5257). Participants were recruited from the Division of Graduate Periodontics of the School of Dentistry at UFRJ, between November/2017 and December/2019. To participate, individuals were informed about the risks and benefits of the study and signed an informed consent form. Subjects had to be  $\geq 18$  years-old and present at least 18 teeth. Exclusion criteria included diagnosed inflammatory systemic diseases, smoking, use of topical or systemic antimicrobials in the last 6 months, use anti-inflammatory in the last 3 months, periodontal therapy in the last 6 months, need for antibiotic prophylaxis, orthodontic treatment, pregnancy or nursing.

### **2.2 Study outcome and sample size**

The primary outcome variable was the frequency of detection of enterococci in the subgingival biofilm of the population. The sample size calculation took into consideration an estimated  $\alpha$  error of 5% and a power of 85% to detect a difference of 15% in the prevalence of these microorganisms among patients with periodontal diseases (PD) and health (PH), with a ratio of 2:1 of cases/controls. Assuming a possible dropout of 15%, 175 individuals with PD and 87 with PH were estimated.

### 2.3 Clinical examination

Eligible individuals were evaluated regarding demographic, medical and dental health history by anamnesis questionnaires. Periodontal clinical measurements were performed by a single calibrated examiner (L.C.P.E.) using a UNC-15 probe\*. Intra-examiner ICC for probing pocket depth (PPD) and clinical attachment level (CAL) were 0.90 and 0.92, respectively.

The periodontal parameters evaluated included PPD and CAL (mm), presence of supragingival plaque (PL), bleeding on probing (BOP), gingival inflammation (GI), calculus (CA) and suppuration (SUP), at 6 sites per tooth of all teeth, except third molars. Individuals were diagnosed as presenting periodontal health (PH), gingivitis (G) or periodontitis (P), with adjustments for the current classification.<sup>22,35</sup> All individuals with G and P and other dental needs were referred for treatment at the Department of Dental Clinic of the School of Dentistry of UFRJ.

### 2.4 Subgingival biofilm sampling

After removal of supragingival plaque and isolation of the area, subgingival biofilm samples were collected using sterile curettes<sup>†</sup> from 8 sites per patient. In PH patients, samples from 2 healthy sites (1 posterior tooth and one anterior tooth) were obtained per quadrant. The same procedure was performed in patients with G (8 samples of sites with gingivitis) and P (8 samples from the deepest periodontal pockets). The 8 samples/patient were pooled into cryogenic tubes containing Mycoplasma Broth<sup>‡</sup> with 5% Dimethyl sulfoxide<sup>§</sup>, and immediately taken to the laboratory for proper processing. In addition, subgingival samples from another 14 different periodontal sites of P patients (7 healthy and 7 diseased sites), 14 healthy sites of PH individuals, and 14 sites of G patients (7 healthy and 7 sites with gingival inflammation) were individually collected using sterile curettes<sup>†</sup> and placed into microtubes containing 150 µl of TE buffer for analysis of the periodontal microbiota using the checkerboard DNA-DNA hybridization (Appendix 1, Table S1).

### 2.5 Isolation of bacterial strains of *Enterococcus* spp. from subgingival biofilm

Subgingival biofilm samples stored in Mycoplasma-DMSO broth were vigorously mixed and an aliquot inoculated into Enterococcosel<sup>||</sup> and Brain Heart Infusion<sup>¶</sup> broths at 37°C for 48h. Cultures with microbial growth were later plated on Enterococcel Agar<sup>#</sup> medium and incubated at 37°C for 48h. Samples with no growth on

selective media agar were inoculated again and left for days of incubation to confirm the absence of enterococci in that subgingival biofilm sample. Colonies grown on plates were characterized as enterococci through the hydrolysis of esculin in the presence of 40% of bile, cell morphology and Gram stain. Potential enterococci colonies were isolated, cultivated and subsequently identified by the matrix assisted laser desorption technique\*\*.

## **2.6 Antimicrobial susceptibility of oral strains of *Enterococcus* spp.**

Enterococci isolated strains were initially seeded on Trypticase Soy Agar (TSA)<sup>††</sup> for 18-24h at 35°C. Bacterial suspensions were adjusted to obtain an inoculum ~ 10<sup>8</sup> CFU/mL (0.5 standard of the McFarland turbidity scale), and inoculated onto Mueller-Hinton agar plates<sup>‡‡</sup> with sterile swabs to achieve confluent growth. Antibiotic discs were deposited on the inoculated plates and the inhibition halos were measured after 16-18h of incubation at 35°C. Antimicrobial susceptibility was determined for 9 antimicrobials: ciprofloxacin; ampicillin, vancomycin; erythromycin; doxycycline; minocycline; rifampicin; chloramphenicol; and linezolid<sup>§§</sup>. The test interpretation was performed according to the CLSI,<sup>36</sup> and the *E. faecalis* ATCC 25923 reference strain was used as control.

## **2.7 Genotypic identification of virulence factors of oral strains of *Enterococcus* spp.**

DNA from fresh enterococci isolates (grown on TSA for 24h) was extracted, purified<sup>37</sup> and measured using the NanoDrop<sup>||||</sup>. Genes encoding the following virulence factors were evaluated: collagen- binding antigen (*ace*), aggregation substance (*asa* and *asa 373*), biofilm on plastic surfaces (*bopD*), hemolysin activator (*cylA*), endocarditis antigen (*efaA*), gelatinase (*gelE*), surface protein (*esp*), and the locus that regulates gelatinase production (*ef1841/fsrC7*). PCR reactions were performed in a final volume of 50 µl, containing 5 µl of 10X PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 1.25 U of Taq DNA polymerase<sup>¶¶</sup>, 20 pmol of each primer and 5 µl of strain DNA (~200 ng). DNA from strains positive for each virulence factor were used as controls. The sequence of the primers, as well as the conditions used to perform the PCR for all virulence factors are presented in Appendix 1, Table S2.



## 2.8 Statistical Analysis

Data was analyzed using the *Statistical Package for the Social Sciences 21.0*<sup>##</sup>. Data entry was carried out by one investigator (L.C.P.E.), and error proofed by a senior investigator (A. P. V. C.). Clinical and demographic parameters, as well as the frequency of detection of enterococci, virulence factors and antimicrobial susceptibility were computed for each individual and then averaged for each clinical group. The prevalence of each subgingival taxa determined by checkerboard was computed by patient and groups. Differences among groups regarding all parameters, as well as associations between detection of enterococci, virulence factors, antimicrobial susceptibility and the prevalence of subgingival microbiota taxa were sought by the Chi-square, Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests. The level of significance was set at 5%.

## 3. Results

### 3.1 Demographic and clinical characteristics of the study population

A total of 547 individuals were eligible based on the selection criteria. They were evaluated for their periodontal clinical condition, being classified into 3 major groups: PH (n = 139); G (n = 103) and P (n = 305) patients (Figure 1). Demographic and clinical data are presented in Table 1. PH individuals were significantly younger and presented a higher proportion of White people with higher socio-economic status compared to the other groups, whereas P patients were older, of lower education level, and presented more plaque, inflammation and attachment loss ( $p < 0.01$ ). Among the 305 P patients, 77.9% had advanced disease (stages III and IV). Moreover, individuals with stages III e IV were on average 10 years older and of lower socio-economic level compared to patients with stages I and II ( $p < 0.01$ ; data not shown).

### 3.3 *Enterococcus spp.* identification and frequency

Of all 547 subgingival biofilm samples cultivated, 137 isolates (24.8%) grew on selective medium, but only 41 (29.9) were identified as *Enterococcus spp.*; 11% were not identified and 59.1% were identified as other species (Figure 2). Overall, 7.4% of *Enterococcus spp.* were isolated from all biofilm samples. Among enterococci isolates, the most prevalent species identified were *E. faecalis* (53.7%) and *E. durans* (9.8%), whereas 29.3% of the isolates were not identified at the species level (Figure 2). Most of the 41 enterococci isolates were from P samples (73.2%). Although the prevalence of enterococci was low in this population, a significantly higher frequency of these

microorganisms was observed in the subgingival biofilm of individuals with periodontal diseases (G=7.8%; P=9.8%) compared to healthy controls (PH=2.2%;  $p<0.05$ ). On the other hand, no differences in the detection of enterococci among P patients with different levels of disease severity were seen ( $p>0.05$ ; Figure 3).

### **3.4 Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus spp.***

Thirteen strains of *Enterococcus spp.* could not be recovered from frozen stocks, so antibiograms were performed for 28 strains. Only 3 strains were sensitive to all antimicrobials. Few strains showed resistance or intermediate sensibility to ampicillin, vancomycin, minocycline and chloramphenicol. The antimicrobials with the highest total % of low susceptibility and/or resistance included ciprofloxacin, erythromycin, rifampicin, and linezolid. No significant differences regarding resistance for each individual antimicrobial were detected among groups. However, 60.7% of the strains resistant to at least one antimicrobial (64.3%) were isolated from periodontitis samples ( $p<0.05$ ; Table 2).

### **3.5 Genotypic identification of virulence factors of *Enterococcus spp.***

Table 3 shows the frequency of detection of the genes encoding important virulence factors of enterococci in 28 strains isolated from the three clinical groups. Only the genes *asa373* and *cylA* were not detected. The most prevalent gene factors were *ace* (64.3%), *asa* (39.3%) and *esp* (35.7%). Due to the small number of strains (4) from PH and G patients, comparisons of detection of these factors among clinical groups were not performed. When analyzing only P individuals, no differences for these factors were found in relation to stages of disease severity (data not shown). Ten of the 28 strains of *E. faecalis* presented  $\geq 4$  of the 9 virulence genes tested. Significant associations among enterococci carrying or not different virulence genes were observed mainly for *esp*, *efaA*, *ef1841/fsrC* ( $p<0.01$ ). For instance, 100% of strains not carrying *esp* were also negative for *efaA*, while 100% of enterococci positive for *efaA* were also positive for *esp* and *ef1841/fsrC* genes. The presence or absence of the genes *ace* and *gelA* did not correlate significantly to any of the other genes (Appendix 1, Table 3S).

### 3.6 Association between the subgingival microbiota taxa and *Enterococcus* spp. detection, virulence and antimicrobial susceptibility

The subgingival microbiota of the 137 individuals from whom samples showed growth on enterococcal selective media were analyzed by 42 DNA probes and checkerboard (Appendix 1). *Fusobacterium nucleatum* was significantly more prevalent in the subgingival microbiota of *Enterococcus* spp.-positive individuals (69%) than enterococci-negative patients (54%), whereas *Candida albicans* was decreased in enterococci-positive (64%) compared to enterococci-negative patients (89%;  $p=0.03$ ; data not shown). Regarding virulence factor genes, the subgingival microbiota of patients with biofilm-positive enterococci (*bopD*+) presented lower mean frequency of *Dialister pneumosintes* ( $29\pm 13\%$ ) than the microbiota of individuals with *bopD*- enterococci ( $61\pm 9\%$ ;  $p<0.05$ ; data not shown). The mean frequency of subgingival taxa was compared among samples with enterococci isolates presenting different susceptibility to the 9 antimicrobials tested. Significant differences in the prevalence of few subgingival species were observed for doxycycline, rifampicin and minocycline (Appendix 1; table S4). Overall, these species were detected significantly more often in the subgingival microbiota of patients harboring enterococci susceptible to the 3 drugs, mainly the oral streptococci ( $\geq 70\%$ ). These species and *P. gingivalis* were also prevalent in the microbiota of individuals carrying enterococci of intermediate susceptibility to doxycycline ( $p<0.05$ ). Moreover, the microbiota harboring enterococci with intermediate sensitivity to rifampicin showed  $> 80\%$  of *Sanguinis streptococci* group (table S4). On the other hand, a significantly higher proportion of enterococci susceptible to doxycycline (80%) did not carry the *bopD* and *esp* virulence genes ( $p<0.01$ ; data not shown).

## 4. Discussion

*Enterococcus* spp. are not common members of the healthy oral microbiota;<sup>7,8</sup> however, these opportunistic pathogens have been associated to poor oral hygiene, therapeutic failure and oral diseases.<sup>9,10,20</sup> The ability of enterococci to colonize the oral cavity and contribute to the onset, progression or recurrence of oral infections are not fully understood, but their various virulence traits and resistance to several antimicrobials may justify in part their high occurrence in individuals with periodontal diseases.<sup>12,23,32-</sup>  
<sup>34</sup> In this investigation, we aimed to determine the prevalence of oral enterococci in the subgingival biofilm of individuals with periodontal health and diseases, correlating their frequency with virulence, antimicrobial susceptibility, disease severity and the

composition of the subgingival microbiota in a large convenience sample population. Using microbial culture, an overall low number of enterococci strains (7.4%) were isolated from over 500 biofilm samples, with more than half of those being *E. faecalis* (53.7%). Comparisons between our findings and literature data must take into consideration significant methodological differences among studies, in particular the sampling and identification methods used. In general, higher detection rates of oral *Enterococcus* spp. are reported by investigations using culture-independent methods or saliva/oral rinse samples.<sup>4,22,24-26,34</sup> In contrast, oral enterococci have commonly been detected in lower prevalence when microbial cultivation is used.<sup>4,11,27,38</sup> In accordance with our data, Rams et al.<sup>38</sup> were able to isolate around 6% of enterococci strains from a large number of subgingival plaque samples from periodontitis patients, whereas other investigators reported detection rates around 7% in oral rinses from patients with oral diseases.<sup>11,39</sup> Higher frequencies, however, have been found in subgingival biofilm samples from an Indian population (26.8%), as well as in oral rinses from a healthy Brazilian cohort (16.6%), and saliva (21.8%) from healthy North Americans.<sup>15,27</sup> Although we employed selective media for isolation of enterococci, all subgingival samples were also cultivated in rich media (BHI broth), so that negative cultures in enterococcal media were repeated to guarantee the recovery of these species from the mixed culture. Even after longer incubation and re-inoculation, just 25% of the biofilm samples (137) were able to show any growth on selective media. Of those, 29.9% were later identified as *Enterococcus* spp. Hence, variation in enterococci detection rates may occur as a result of various factors other than detection techniques.

Regardless of the methodology employed, our findings agree with the majority of the investigations, showing a higher isolation/detection rate of oral enterococci, mainly *E. faecalis*, from individuals with periodontal diseases (G, 7.8% and P, 9.8%) than PH controls (2.2%). Over 70% of our isolates were from P patients. Likewise, other authors did not detect or detected very low numbers of enterococci in PH patients, but reported greater prevalence of these microorganisms (ranging from 20-50%) in P individuals than we did.<sup>24-27,32</sup> Thus, oral enterococci are rare in the oral cavity of healthy individuals, but may increase significantly in the subgingival biofilm associated with periodontitis. In fact, *E. faecalis* may be present in different layers of the oral biofilm, interacting with different oral species.<sup>40,41</sup> Moreover, *E. faecalis* can form biofilm,<sup>2,21</sup> adhere and invade gingival epithelial cells,<sup>28</sup> and survive in hostile environments such as the periodontal pocket.<sup>42</sup>

Synergistic and/or antagonist interactions among various microorganisms occur constantly within the subgingival biofilm, and they become even more complex within a periodontitis-associated dysbiotic microbiota. We have examined possible associations between the isolation of enterococci and the subgingival oral taxa. *F. nucleatum* was significantly more prevalent in the subgingival microbiota of *Enterococcus* spp.-positive than negative individuals. Both species are known to interact with a large number of species in biofilm-associated polymicrobial infections.<sup>2</sup> Co-aggregation of *F. nucleatum* with *E. faecalis* and oral streptococci in biofilm appears to be selective and mediated by a conserved hypothetical protein Aid1 (Adhesion Inducing Determinant 1), suggesting that expression or suppression of this protein is important for recognition and discrimination by *F. nucleatum* of specific Gram-positive cocci to interact at different stages of dental biofilm development.<sup>43</sup> Conversely, a significantly low frequency of *C. albicans* was found in enterococci-positive individuals, corroborating the antagonistic relationship between these species. Studies have shown that the enterocin EntV inhibits *C. albicans* hyphal morphogenesis and biofilm formation, reducing its pathogenicity in a biofilm-associated oropharyngeal candidiasis.<sup>44</sup> Of interest, we also found a low prevalence of the periodontal pathogen candidate *D. pneumosintes* in patients presenting enterococci carrying the biofilm on plastic surfaces gene (*bopD*+), an essential factor in biofilm formation.<sup>18</sup> In a previous study, we associated the co-occurrence of major periodontal pathogens and non-oral pathogens with severity of periodontitis. Although *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) was a major predictor for advanced periodontitis (previously defined as aggressive periodontitis), the co-occurrence of Aa and *E. faecalis* was related to less severe disease or periodontal health in the regression model.<sup>22</sup> Thus, *E. faecalis* may attenuate or increase the virulence of specific pathogens within biofilms associated with various diseases, depending on the selective pressure of ecological determinants in the microenvironment.

Enterococci virulence factors related to colonization, tissue invasion, biofilm formation, resistance to host defense and persistence at the infected site were evaluated in 28 of the 41 enterococci isolates. The most predominant genes were *ace* (64.3%), *asa* (39.3%) and *esp* (35.7%), which are key surface components of enterococci responsible for attachment to extracellular matrix proteins (collagen and laminin), cell invasion and for promoting biofilm formation.<sup>2,5,12</sup> Three virulence genes also related to the ability of enterococci to form biofilm (*gelE*, *bopD* and *Ef1841/fsrFsrC*) and promote degradation of host components (*gelE*) were detected in 32.1% of the isolates, whereas the

endocarditis adhesion factor *efaA* was found in only 17.9% of the strains. Other authors have found even higher frequencies of these genes in oral enterococci from mucosal, endodontic and periodontal infections.<sup>5,14,17,18,20,45-47</sup> However, the genes *asa373* and *cylA* were not detected in any strain, as reported in some studies.<sup>17,45</sup>

Although biofilm formation, gelatinase and hemolytic activities were not evaluated here by phenotypic methods, >66% of *bopD*<sup>+</sup> strains were also *ace*<sup>+</sup>, *asa*<sup>+</sup> and *esp*<sup>+</sup>, supporting the association among biofilm and these genes.<sup>5,17,18</sup> In contrast, only 3 of 9 *bopD*<sup>+</sup> strains were *gelE*<sup>+</sup>.<sup>14,15,20</sup> The gelatinase-negative phenotype is associated with an endopeptidase enzyme encoded by the *Ef1841/fsrFsrC* gene cluster.<sup>18</sup> Six of 9 strains presenting *Ef1841/fsrFsrC* were *gelE*-negative, indicating a possible negative phenotype. The putative endocarditis antigen gene (*efaA*) is commonly expressed in oral enterococci,<sup>4,11,29,46</sup> but only 5 of our isolates were positive for this gene. Overall, 57% of the 28 enterococci strains presented two or more of the virulence gene factors tested. Associations among the presence or absence of genes *esp*, *asa*, *bopD*, *efaA* and *ef1841/fsrC* were significant, suggesting possible regulatory mechanisms among these factors. Lack of *esp* gene seems to be related to absence of *bopD*, *efaA* and *ef1841/fsrC*. The presence of single or multiple virulence genes in subgingival enterococci may certainly contribute to the pathogenesis of periodontal diseases, as well as pose a potential risk for infective endocarditis after conventional periodontal therapy.<sup>12</sup>

In addition to virulence, 64.3% of these strains showed resistance to at least one antimicrobial. Only 11% of the isolates were sensitive to all antimicrobials, and very few strains showed resistance or intermediate sensibility to ampicillin (1), vancomycin (6), minocycline (5) and chloramphenicol (1). However, high rates (>55%) of enterococci presenting low susceptibility and/or resistance to ciprofloxacin (68%), erythromycin (82%) and rifampicin (57%) were observed, whereas around 29% of the isolates showed low sensitivity to doxycycline. The majority of studies testing susceptibility of oral enterococci from dental plaque or oral rinses also showed low or no resistance to penicillins, vancomycin and chloramphenicol,<sup>4,11,15,18,38,46</sup> except for Bhardwaj et al.<sup>32</sup> who reported 13.3% of resistance to vancomycin in India, and Gaetti-Jardim et al.<sup>48</sup> who showed high resistance rates to penicillins (30%) and chloramphenicol (47%) in oral samples from Brazilians with periodontal diseases. High resistance of oral enterococci to tetracyclines (24-54%) and erythromycin (29-43%) is reported by several authors.<sup>4,11,15,18,38</sup> Nevertheless, only 2 studies have detected similar rates of resistance for erythromycin (80-100%) in saliva/dental plaque enterococci.<sup>5,38</sup> Moreover, no

investigations have reported such high prevalence of oral enterococci presenting low sensitivity or resistance to ciprofloxacin and rifampicin as we did.<sup>4,5,11,48</sup> Resistance/low sensitivity to ciprofloxacin, when detected, ranged from 9-13%.<sup>18,32,34,38</sup> The increased resistance to drugs of the tetracycline, quinolone and macrolide classes in subgingival enterococci is alarming, given that these antimicrobials are prescribed for periodontal treatment.<sup>34</sup> In addition, enterococci have high rates of horizontal transfer of antibiotic resistance genes within biofilms, particularly with oral bacteria of the dental plaque.<sup>30,49</sup> Hence, oral enterococci may constitute a reservoir of resistance genes that in the oral biofilm community may be easily disseminated to other oral and non-oral bacterial species, impairing further antimicrobial therapies for various human infections.

## 5. CONCLUSION

*Enterococcus* spp., mainly *E. faecalis* are detected in low prevalence in the oral microbiota, but their frequency increases significantly in the dysbiotic subgingival biofilm of patients with periodontal diseases. The disease-related enterococci were shown to carry several virulence genes and express high rates of resistance to antibiotics commonly used in dental therapies. Associations between detection, antimicrobial susceptibility of enterococci and the prevalence of specific oral taxa were found, reinforcing the complex network among these microorganisms within the subgingival biofilm, including the potential transfer of resistance genes to oral bacteria. Although the role of oral enterococci in the progression, persistence and/or therapeutic failure of periodontal diseases is not clear, our findings and data reported in the literature supports the plausibility of an additional contribution of these species in inflammation, tissue destruction, antibiotic resistance dissemination and poor response to antimicrobial therapy in these diseases.

### Footnotes

\*UNC-15, Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

†Gracey curets, scaler Hu-Friedy, Chicago, IL, USA

‡ Mycoplasma broth, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil

§ DMSO, Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brazil

|| Enterococcel broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA

¶ Brain heart infusion broth, Becton, Dickinson and Company

# Enterococcel Agar, Becton, Dickinson and Company

\*\* MALDI-ToF; Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA

†† Trypticase Soy Agar, Becton, Dickinson and Company

‡‡ Müeller-Hinton agar, Becton, Dickinson and Company

§§ Antibiotic discs, Cecon, São Paulo, SP, Brazil

||| NanoDrop<sup>|||</sup>, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA ¶¶ Oxoid Brasil, Pinheiros, SP, Brazil

¶¶ Taq DNA polymerase, Invitrogen, São Paulo, Brazil,

## SPSS, IBM Brazil, SP, Brazil

### Acknowledgments

This study was supported in part by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq); Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brasilia, Brazil; Foundation for Research Financial Support in the State of Rio de Janeiro (FAPERJ), Rio de Janeiro, Brazil. The authors appreciate the collaboration of all individuals who participate of this study.

### References

- 1- Kafil HS, Mobarez AM. Spread of Enterococcal surface protein in antibiotic resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates from urinary tract infections. *Open Microbiol J* 2015; 9:14–17.
- 2- Ch'ng J, Chong KKL, Lam LN. *et al.* Biofilm-associated infection by enterococci. *Nat Rev Microbiol* 2019;17(2): 82–94.
- 3- WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. World Health Organization. Available on: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>.
- 4- Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19(2):95-101.
- 5- Anderson AC, Jonas D, Huber I, et al. *Enterococcus faecalis* from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation. *Front Microbiol* 2016; 6: 1534.
- 6- Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67 (4):1628–1635.
- 7- Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J* 2009;42(4):277-87.



- 8- Razavi A, Gmuir R, Imfeld T, Zehnder M. Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects. *Oral Microbiology and Immunology* 2007; 22:248–51.
- 9- Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod* 2006;32(8):722-6.
- 10- Balaei-Gajan E, Shirmohammadi A, Abashov R, Agazadeh M, Faramarzie M. Detection of *enterococcus faecalis* in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2010;15(4):e667-70.
- 11- Salah R, Dar-Odeh N, Abu Hammad O, Shehabi AA. Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates from patients with dental Diseases. *BMC Oral Health* 2008;1(8):17.
- 12- Najafi K, Ganbarov K, Gholizadeh P, et al. Oral cavity infection by *Enterococcus faecalis*: virulence factors and pathogenesis. *Reviews in Medical Microbiology* 2020;31(2):51-60.
- 13- Holmberg A, Rasmussen M. Mature biofilms of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* are highly resistant to antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;84(1):19-21.
- 14- Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF Jr, dos Santos KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. *Res Microbiol* 2011;162(2):151-8.
- 15- Komiyama EY, Lepesqueur LS, Yassuda CG, et al. *Enterococcus* Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility. *PLoS One* 2016;11(9): e0163001.
- 16- Bhatti M, Cruz MR, Frank KL, et al. *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance) and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation and virulence. *Mol Microbiol* 2015;95(4):660-77.
- 17- Akbari Aghdam M, Soroush Barhaghi MH, Aghazadeh M, et al. Virulence genes in biofilm producer *Enterococcus faecalis* isolates from root canal infections. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2017;63(5):55-59.
- 18- Di Rosa R, Creti R, Venditti M, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 256(1):145-50.

- 19- Soares RO, Fedi AC, Reiter KC, Caierão J, d'Azevedo PA. Correlation between biofilm formation and gelE, esp, and agg genes in *Enterococcus* spp. clinical isolates. *Virulence* 2014;5(5):634-7.
- 20- Wang L, Dong M, Zheng J, et al. Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *J Endod* 2011;37(5):631-6.
- 21- Lim SY, Teh CSJ, Thong KL. Biofilm-Related Diseases and Omics: Global Transcriptional Profiling of *Enterococcus faecium* Reveals Different Gene Expression Patterns in the Biofilm and Planktonic Cells. *OMICS* 2017;21(10):592-602.
- 22- La Rosa SL, Montealegre MC, Singh KV, Murray BE. *Enterococcus faecalis* Ebp pili are important for cell-cell aggregation and intraspecies gene transfer. *Microbiology (Reading)* 2016;162(5):798-802.
- 22- da Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Luiz RR, Colombo AP. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2011;56(9):899-906.
- 23- Sun J, Sundsfjord A, Song X. *Enterococcus faecalis* from patients with chronic periodontitis: virulence and antimicrobial resistance traits and determinants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 267–272.
- 24- Colombo AP, Teles RP, Torres MC, et al. Subgingival microbiota of Brazilian subjects with untreated chronic periodontitis. *J Periodontol* 2002 Apr;73(4):360-9.
- 25- Colombo APV, Magalhães CB, Hartenbach FARR, Souto RM, Silva-Boghossian CM. Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microb Pathog* 2016; 94:27-34.
- 26- Souto R, Colombo AP. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection. *Arch Oral Biol* 2008;53(2):155-60.
- 27- Chidambar CK, Shankar SM, Raghu P, Gururaj SB, Bushan KS. Detection of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilms of healthy, gingivitis, and chronic periodontitis subjects. *J Indian Soc Periodontol* 2019;23(5):416-418.
- 28- Colombo AV, Barbosa GM, Higashi D, di Micheli G, Rodrigues PH, Simionato MRL. Quantitative detection of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* in human oral epithelial cells from subjects with periodontitis and periodontal health. *J Med Microbiol* 2013;62(10):1592-1600.

- 29- Heller D, Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Colombo AP. Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2012; 57(7):973-80.
- 30- Sun J, Sundsfjord A, Song X. Enterococcus faecalis from patients with chronic periodontitis: virulence and antimicrobial resistance traits and determinants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31: 267–272.
- 31- Sun J, Song X, Kristiansen BE, et al. Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis. *J Clin Microbiol* 2009;47(7):2218-25.
- 32- Bhardwaj SB, Mehta M, Sood S, Sharma J. Biofilm Formation by Drug Resistant Enterococci Isolates Obtained from Chronic Periodontitis Patients. *J Clin Diagn Res* 2017;11(1): DC01-DC03.
- 33- Song X, Sun J, Mikalsen T, Roberts AP, Sundsfjord A. Characterisation of the Plasmidome within Enterococcus faecalis Isolated from Marginal Periodontitis Patients in Norway. *PLoS ONE* 2013; 8(4): e62248.
- 34- Rams TE, Feik D, Mortensen JE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility of periodontal Enterococcus faecalis. *J Periodontol* 2013; 84: 1026–33.
- 35- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol* 2018;45(20): S1-S8.
- 36- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute M100, vol. 28. Wayne, PA; 2018.
- 37- Smith GL, Socransky SS, Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1989;4: 47-51.
- 38- Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7(4):249-52.
- 39- Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral Enterococcus faecalis in humans. *Arch Oral Biol* 2005; 50(6):575-83.
- 40- Johnson EM, Flannagan SE, Sedgley CM. Coaggregation interactions between oral and endodontic Enterococcus faecalis and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *J Endod* 2006;32(10):946-50.
- 41- Thurnheer T, Belibasakis GN. Integration of non-oral bacteria into in vitro oral

- biofilms. *Virulence* 2015;6(3):258-64.
- 42- Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* 2009;35(7):950-7.
- 43- Kaplan A, Kaplan CW, He X, McHardy I, Shi W, Lux R. Characterization of aid1, a novel gene involved in *Fusobacterium nucleatum* interspecies interactions. *Microb Ecol* 2014;68(2):379-87.
- 44- Graham CE, Cruz MR, Garsin DA, Lorenz MC. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(17):4507-4512.
- 45- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *J Endod* 2016;42(7):1022-8.
- 46- Dahlén G, Blomqvist S, Almståhl A, Carlén A. Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections. *J Oral Microbiol* 2012; 4:10.
- 47- Singh KV, Nallapareddy SR, Sillanpää J, Murray BE. Importance of the collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against *Enterococcus faecalis* experimental endocarditis. *PLoS Pathog* 2010;6(1):e1000716.
- 48- Gaetti-Jardim EC, Marqueti AC, Faverani LP, Gaetti-Jardim E Jr. Antimicrobial resistance of aerobes and facultative anaerobes isolated from the oral cavity. *J Appl Oral Sci* 2010;18(6):551-9.
- 49- Sedgley CM, Lee EH, Martin MJ, Flannagan SE. Antibiotic resistance gene transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals of teeth ex vivo. *Journal of Endodontics* 2008;34(5):570-574.

**Table 1.** Demographic and clinical periodontal data of the study population.

Parameters	Periodontal Health (n=139)	Gingivitis (n=103)	Periodontitis (n=305)
Mean (SD) age (years) †	28.3 (11.1)	29.2 (12.0)	43.5 (12.9)
<b>Gender</b>			
% males	29.5	31.1	39.3
% females	70.5	68.9	60.7
<b>Race*</b>			
% White	70.8	47.6	42.0
% African Americans	8.8	16.5	21.5
% Mullanos/Mestizos/others	20.4	35.9	36.4
<b>% monthly family income*</b>			
up to 1 minimum wage	6.8	21.5	28.2
up to 2 minimum wages	10.5	26.5	39.0
more than 2 minimum wages	82.7	52.0	32.8
<b>% Education*</b>			
Elementary School	1.5	5.0	19.0
High school	11.0	51.5	43.0
Higher education	87.5	43.5	38.0
<b>Mean (SD) of periodontal parameters †</b>			
N of missing teeth	0.9 (2.0)	1.9 (3.1)	4.0 (4.1)
PD (mm)	1.8 (0.3)	2.0(0.2)	3.0 (1.0)
CAL (mm)	1.8 (0.5)	2.0 (0.4)	3.4 (1.3)
% sites with BOP	3.5 (3.2)	21.2 (14.8)	41.9 (26.8)
% sites with PL	10.9 (12.2)	35.7 (16.6)	51.1 (23.2)
% sites with GI	2.6 (3.6)	19.9 (10.2)	24.9 (18.7)
% sites with CA	4.5 (6.9)	8.2 (8.0)	24.5 (18.3)
% sites with SUP	0	0	0.5 (2.2)
% sites with PD ≥ 5 mm	0	0	15.5 (18.9)
% sites with CAL > 5 mm	0	0	13.4 (18.7)
<b>Stages of Periodontitis (%) ‡</b>			
I			4.9
II			17.4
III			43.0
IV			34.8

PD, probing depth; CAL, clinical attachment level; BOP, bleeding on probing; PL, supragingival plaque; GI, gingival bleeding; CA, calculus; SUP, suppuration; SD, standard deviation. \*Significant differences among periodontal clinical groups (Chi-square test,  $p < 0.01$ ); †Significant differences among clinical groups (Kruskal-Wallis,  $p < 0.01$ ). ‡ Stages of Periodontitis according to the current classification.<sup>35</sup>

**Table 2.** Antimicrobial susceptibility of 28 enterococci strains isolated from subgingival biofilm of individuals with periodontal health and diseases.

Antimicrobials	Susceptibility	Periodontal Health	Gingivitis	Periodontitis	Total % of low sensibility or resistance
Ampicillin	S	1	3	23	3.6
	R	0	0	1	
Ciprofloxacin	S	0	2	7	67.9
	I	1	1	16	
Chloramphenicol	R	0	0	1	3.6
	S	1	3	23	
Doxycycline	I	1	2	17	28.6
	R	0	1	3	
Erythromycin	S	0	1	4	82.1
	I	1	2	18	
Linezolid	R	0	0	2	32.1
	S	1	2	16	
Minocycline	I	0	1	5	21.4
	R	0	0	3	
Rifampicin	S	1	2	19	57.1
	I	0	1	5	
Vancomycin	R	0	2	10	21.4
	S	1	3	18	
Resistance to $\geq 1$ antimicrobial*	I	0	0	6	64.3
	-	0	3	7	
	+	1	0	17	

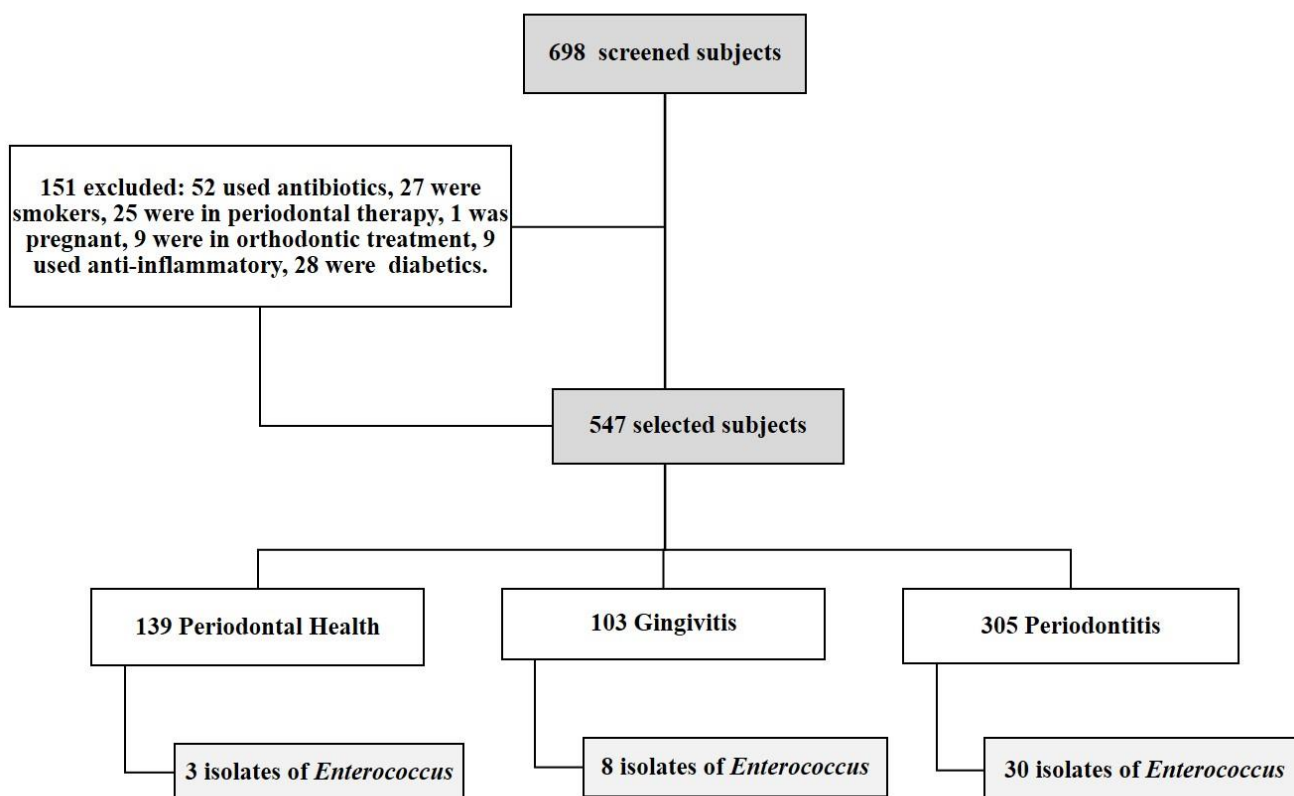
Susceptibility analysis was performed according to CLSI<sup>36</sup>. S=susceptible;

I=intermediate; R=resistant; \*Significant difference among clinical groups (Chi-square, p=0.04).

**Table 3.** Frequency of detection of virulence factors genes of 28 *Enterococcus spp.* isolated from subgingival samples of individuals with periodontal health and diseases.

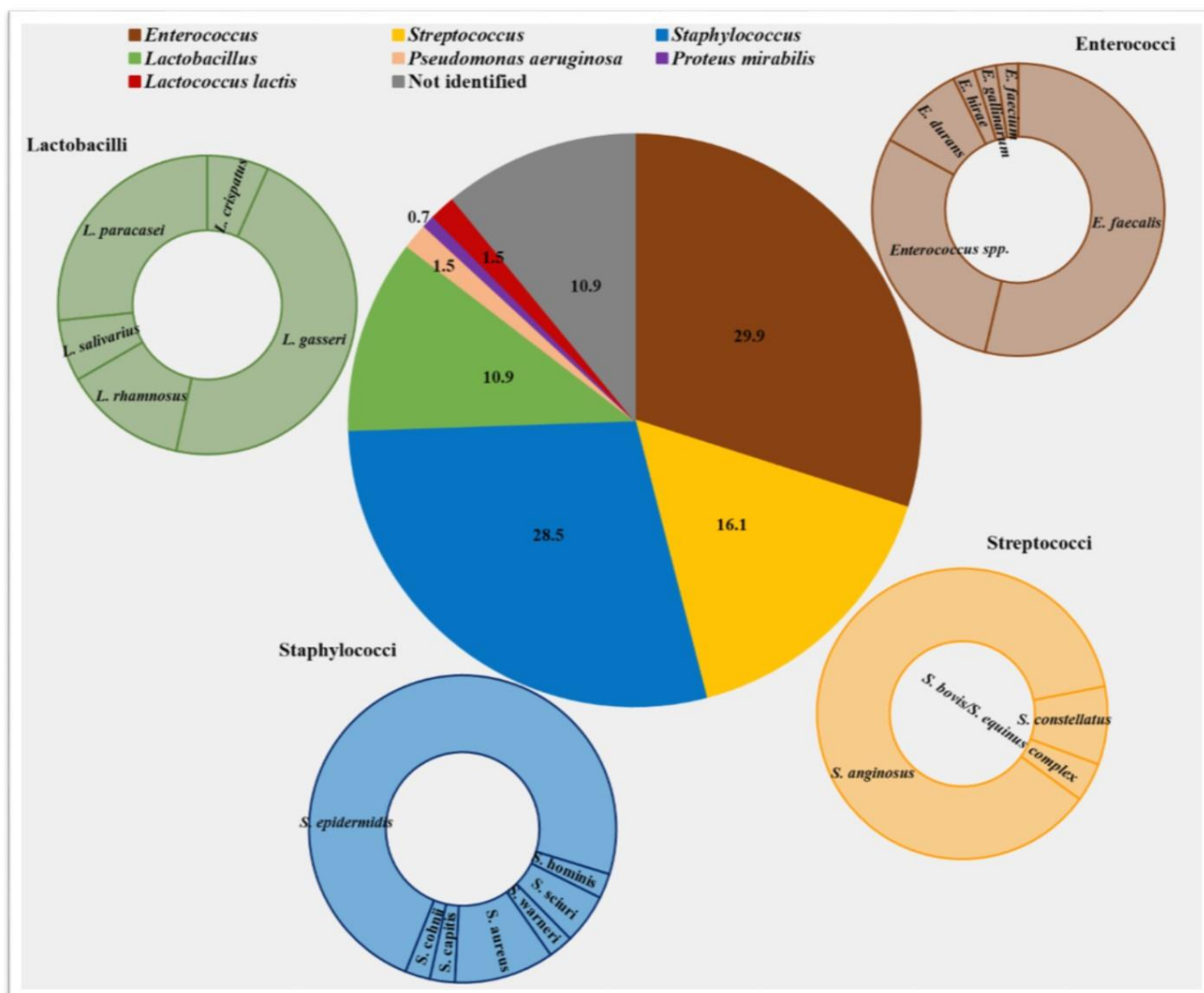
<i>Enterococcus spp.</i> Isolates	Clinical group	<i>ace</i>	<i>asa</i>	<i>bopD</i>	<i>EfaA</i>	<i>gelE</i>	<i>esp</i>	<i>ef1841/</i> <i>fsrC</i>
<i>E. faecalis</i>	PH	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	G	+	+	-	-	-	-	-
<b><i>E. faecalis</i></b>	<b>G</b>	+	+	+	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	G	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. durans</i>	P	+	+	-	-	-	-	+
<i>E. durans</i>	P	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	P	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	P	+	+	+	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	P	-	-	-	+	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	P	-	+	-	-	+	+	+
<i>E. faecalis</i>	P	-	-	-	+	-	+	+
<i>E. faecium</i>	P	+	+	+	-	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	P	-	-	+	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	P	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	P	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. durans</i>	P	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecalis</i>	P	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	P	-	-	-	-	+	-	-
<b><i>E. faecalis</i></b>	<b>P</b>	+	+	-	+	+	+	+
<b><i>E. faecalis</i></b>	<b>P</b>	+	-	+	+	-	+	+
<i>E. faecalis</i>	P	+	+	+	-	-	-	+
<i>E. faecalis</i>	P	+	-	+	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i>	P	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. durans</i>	P	-	-	-	-	-	-	-
<b><i>E. faecalis</i></b>	<b>P</b>	+	+	+	+	-	+	+
<i>E. gallinarum</i>	P	+	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	P	+	+	+	-	-	+	-
<i>E. faecalis</i>	P	+	-	-	-	-	-	-
Total % of detection		64.3	39.3	32.1	17.9	32.1	35.7	32.1

PH= periodontal health; G= gingivitis; P = periodontitis; (+) detection or (-) no detection of the virulence factor gene by PCR. The genes aggregation substance 373 (*asa373*) and cytolysin A (*cylA*) were not detected in any of the strains tested. Four strains (in bold) presented 5 of the 9 virulence genes tested. *ace*: collagen-binding protein; *asa*: aggregation substance; *bopD*: biofilm formation; *efaA*: endocarditis antigen; *gelE*: gelatinase; *esp*: enterococcal surface protein; *ef1841/fsrC*: gelatinase-negative phenotype determinant.



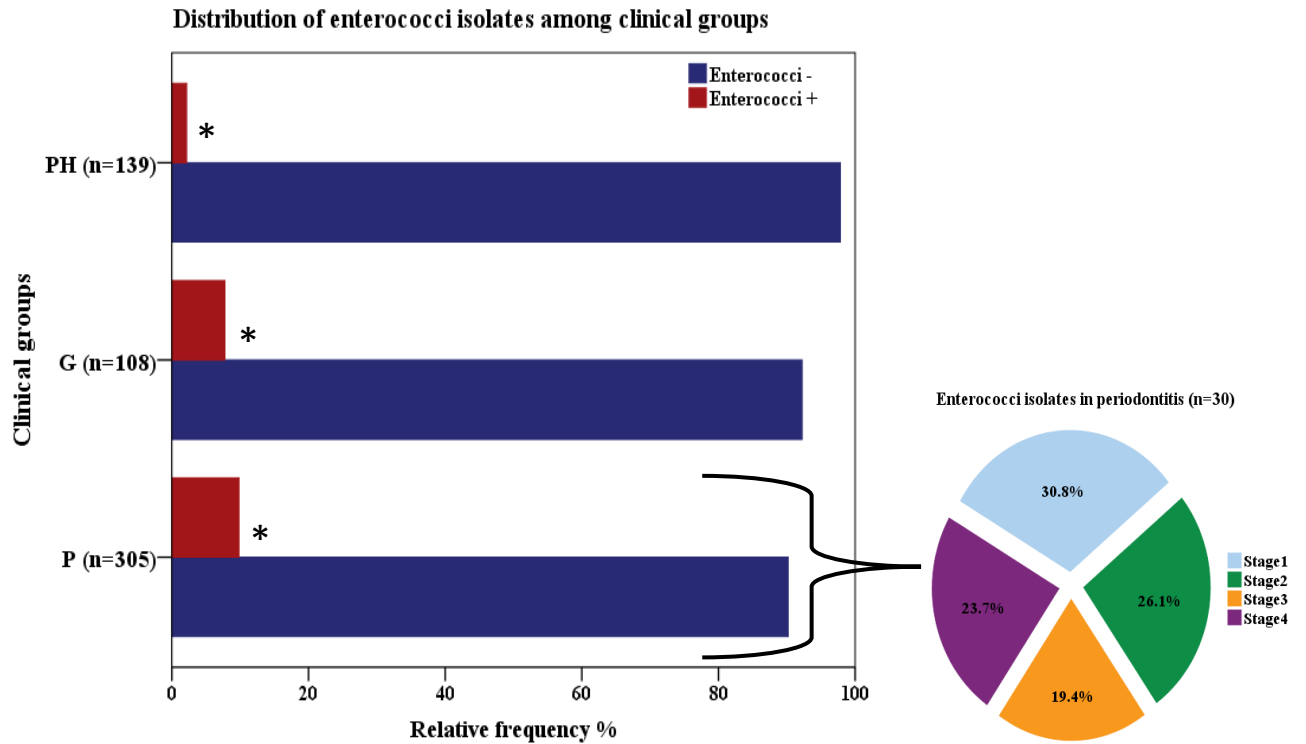
**Figure 1.** Flow chart of the study population. A total of 547 individuals were eligible and their subgingival biofilm sampled. One-hundred and thirty-seven samples showed growth on selective media, but only 41 isolates were identified as enterococci.





**Figure 2.** Identification of 137 strains isolated on enterococcal selective media from 547 subgingival biofilm samples. The pie chart shows the relative frequency (%) at the genus level and the donuts represent the frequency (%) at species level of the identified strains. *Enterococcus* spp. were detected in 29.9% of the grown isolates, but the overall prevalence in subgingival samples was low (7.4%). The most prevalent enterococci species identified was *E. faecalis* (53.7%).

Fig. 3



**Figure 3.** Frequency distribution of enterococci among isolates from clinical groups (PH, periodontal health; G, gingivitis; P, periodontitis). \*Significant differences among groups (PH=2.2%; G=7.8%; P=9.8%) were observed ( $p > 0.05$ ; Chi square test). The pie chart shows the distribution of enterococci among 30 isolates from periodontitis patients with distinct disease severity ( $p > 0.05$ ; Chi square test).

## Appendix

**Table S1.** Strains used for construction of whole genomic probes used in the checkerboard

DNA-DNA hybridization technique.

Taxa	Strain*	Taxa	Strain*
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans a</i>	43718	<i>Leptotrichia buccalis</i>	14201
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans b</i>	29523	<b>Lactobacillus probe</b>	
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans c</i>	625 <sup>†</sup>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	4356
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	<i>Lactobacillus casei ss rhamnosus</i>	7469
<b>Actinomyces probe</b>	12102	<i>Lactobacillus oris</i>	49062
<i>Actinomyces israelii</i>	12102	<b>Neisseria probe</b>	
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	17929	<i>Neisseria meningitidis</i>	13077
<i>Actinomyces naeslundii I</i>	12104	<i>Neisseria lactamica</i>	23970
<i>Actinomyces oris</i>	43146	<i>Neisseria polysaccharea</i>	43768
<i>Candida albicans</i>	10231	<i>Neisseria sicca</i>	29256
<i>Clostridium difficile</i>	98689	<i>Neisseria subflava</i>	49275
<i>Corynebacterium matruchotii</i>	14266	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	21824
<b>Capnocytophaga probe</b>		<i>Neisseria mucosa</i>	19696
<i>Capnocytophaga gingivalis</i>	33624	<i>Olsenella uli</i>	49627
<i>Capnocytophaga ochracea</i>	33596	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	27337
<i>Capnocytophaga sputigena</i>	358	<i>Parvimonas micra</i>	33270
<b>Campylobacter probe</b>		<i>Porphyromonas gingivalis</i>	33277
<i>Campylobacter concisus</i>	484	<b>Prevotella probe</b>	
<i>Campylobacter gracilis</i>	33236	<i>Prevotella melaninogenica</i>	25845
<i>Campylobacter showae</i>	51146	<i>Prevotella intermedia</i>	25611
<i>Campylobacter rectus</i>	33238	<i>Prevotella nigrescens</i>	33563
<i>Dialister pneumosintes</i>	33048	<i>Prevotella tanneriae</i>	51259
<i>Eikenella corrodens</i>	23834	<i>Cutibacterium acnes I</i>	11827
<i>Enterococcus faecalis</i>	10100	<i>Cutibacterium acnes II</i>	11828
<b>Eubacterium probe</b>		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10145
<i>Eubacterium saphenum</i>	49989	<i>Rothia dentocariosa</i>	17931
<i>Eubacterium nodatum</i>	33099	<i>Salmonella enteric sorvar Typhi</i>	6539
<i>Eubacterium sabbureum</i>	33271	<i>Selenomonas noxia</i>	43541
<b>Enterobactereacea probe</b>		<b>Milleri streptococci probe</b>	
<i>Pantoea agglomerans</i>	27155	<i>Streptococcus constellatus</i>	27823
<i>Enterobacter cloacae</i>	10699	<i>Streptococcus intermedius</i>	27335
<i>Enterobacter sakazakii</i>	12868	<i>Streptococcus anginosus</i>	33397
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048	<b>Sanguinis streptococci probe</b>	
<i>Enterobacter gergoviae</i>	33028	<i>Streptococcus mitis</i>	49456

<i>Escherichia coli</i>	10799	<i>Streptococcus oralis</i>	35037
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10031	<i>Streptococcus sanguinis</i>	10556
<i>Klebsiella oxytoca</i>	12833	<i>Streptococcus gordonii</i>	10558
<i>Filifactor alocis</i>	35896	<b>Mutans streptococci probe</b>	
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	33693	<i>Streptococcus mutans</i>	25175T
<b>Fusobacterium nucleatum probe</b>		<i>Streptococcus sobrinus</i>	3347
<i>Fusobacterium nuc. ss. nucleatum</i>	25586	<b>CN Staphylococci probe</b>	
<i>Fusobacterium nuc. ss. polymorphum</i>	10953	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228
<i>Fusobacterium nuc. ss. vicentii</i>	49256	<i>Staphylococcus warneri</i>	27836
<b>Gemella probe</b>		<i>Staphylococcus aureus ss aureus</i>	33591
<i>Gemella morbillorum</i>	27824	<i>Tannerella forsythia</i>	43037
<i>Gemella haemolysans</i>	10379	<i>Treponema socranskii</i>	D1 <sup>†</sup>
<i>Hafnia alvei</i>	11604	<i>Treponema denticola</i>	35405D-5
<i>Helicobacter pylori</i>	43504	<i>Veillonella parvula</i>	10790

\*ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); <sup>†</sup> The Forsyth Institute, Cambridge,

MA

**Table S2.** Oligonucleotides and PCR protocols used to identify enterococci virulence factors of isolated strains from subgingival biofilm.

Target DNA gene	Primers sequences	PCR protocol	Amplicon size (bp)
<i>ace</i> <sup>3</sup>	5'- GGAATGACCGAGAACGATGGC-3' 5'- GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG-3'	94°C-2min; 35 cycles X (92°C-30s; 56°C-30s; 72°C-60s); 72°C-2min	616
<i>efaA</i> <sup>3</sup>	5'- GCCAATTGGGACAGACCCTC-3' 5'- CGCCTTCTGTTTCCTTCTTTGGC-3'	94°C-2min; 35 cycles X (92°C-30s; 56°C-30s; 72°C-60s); 72°C-2min	688
<i>asa</i> <sup>4</sup>	5'- CCAGCCAACACTATGGCGGAATC-3' 5'- CCTGTCGCAAGATCGACTGTA-3'	95°C-5min; 30 cycles X (95°C-60s; 58°C-60s; 72°C-60s); 72°C- 10 min	529
<i>asa373</i> <sup>4</sup>	5'- GGACGCACGTACACAAAGCTAC-3' 5'-CTGGGTGTGATTCCGCTGTAA-3'	95°C-5min; 30 cycles X (95°C-60s; 58°C-60s; 72°C -60s); 72°C- 10	619
<i>cylA</i> <sup>4</sup>	5'- GACTCGGGGATTGATAGGC-3' 5'- GCTGCTAAAGCTGCGCTTAC-3'	95°C-5min; 30 cycles X (95°C-60s; 58°C-60s; 72°C-60s);72°C-10 min	688
<i>esp</i> <sup>5</sup>	5'- TTGCTAATGCTAGTCCACGACC-3' 5'- GCGTCAACACTTGCATTGCCGA-3'	94°C-2min; 35 cycles X (92°C-30s;52°C-30s; 72°C-60s);72°C- 2min	932
<i>gelE</i> <sup>5</sup>	5'- ACCCCGTATCATTGGTTT-3' 5'- ACGCATTGCTTTTCCATC-3'	94°C-2min;35 cycles X (92°C-30s; 52°C-30s; 72°C-60s); 72°C- 2min	405
<i>bopD</i> <sup>6</sup>	5'-GGCTTCCTCGTTGATGGCTTC-3' 5'- ACGGCACGGAATTTGGGTAAAC- 3'	94°C-5min; 35 cycles X (94°C-60s, 48°C- 30s; 52°C-60s); 72°C-10 min	1050
<i>ef1841/fsrC7</i> <sup>7</sup>	5'- GATCAAGAAGGGAAGCCACC-3' 5'- CCAACCGTGCTCTTCTGGA-3'	94°C-2min; 35 cycles X (92°C-30s; 56°C-60s; 72°C-2min); 72°C-5 min	126

*ace*: collagen- binding antigen; *efaA*: endocarditis antigen; *asa*: aggregation substance; *asa373*: aggregation substance; *cylA*: hemolysin activator; *esp*: surface protein; *gelE*: gelatinase; *bopD*: biofilm on plastic surfaces; *ef1841/fsrC7*: locus that regulates gelatinase production.

**Table S3.** Association between detection and no detection of various virulence genes in 28 isolates of enterococci from subgingival biofilm samples.

Virulence gene determinants	<i>esp</i>		<i>asa</i>		<i>bopD</i>		<i>efaA</i>		<i>ef1841/fsrC</i>	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<b>N of isolates</b>	(10)	(18)	(11)	(17)	(9)	(19)	(5)	(23)	(9)	(19)
<i>esp</i> +	-----		64%		67%		100%		78%	
<i>esp</i> -	-----			82%		79%		78%		84%
<i>asa</i> +	70%		-----		78%		60%		78%	
<i>asa</i> -		78%	-----			79%		65%		79%
<i>bopD</i> +	60%		64%		-----		NS		NS	
<i>bopD</i> -		83%		88%	-----		NS		NS	
<i>efaA</i> +	50%		NS		NS		-----		50%	
<i>efaA</i> -		100%	NS		NS		-----			100%
<i>ef1841/fsrC</i> +	70%		NS		NS		100%		-----	
<i>ef1841/fsrC</i> -		89%	NS		NS			83%	-----	

Significant associations in frequency of detection (%) of strains carrying or not combinations of virulence genes were observed ( $p < 0.01$ ; Chi-square test). NS: not significant.

**Table S4.** Association between enterococci antimicrobial susceptibility and mean (SEM) prevalence of subgingival oral taxa in biofilm samples from individuals with periodontal health and disease.

Mean % of oral taxa	Enterococci susceptibility to Doxycycline			* <i>P</i> value
	S	I	R	
<i>Dialister pneumosintes</i>	64.2 (9.1)	19.8 (12.2)	17.8 (7.5)	0.030
<i>Enterococcus faecalis</i>	60.9 (9.0)	28.5 (22.1)	5.3 (3.4)	0.019
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	64.7 (9.2)	23.7 (23.7)	0	0.026
<i>Leptotrichia buccalis</i>	60.6 (8.9)	23.3 (23.3)	2.3 (2.3)	0.029
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	70.0 (6.8)	58.0 (14.9)	0	0.025
<i>Milleri streptococci</i>	75.2 (6.3)	56.0 (4.2)	19.0 (12.7)	0.017
<i>Sanguinis streptococci</i>	72.6 (6.3)	69.0 (12.7)	24.0 (8.7)	0.043
<i>Selenomonas noxia</i>	64.8 (9.4)	47.0 (21.2)	0	0.040
<i>Tannerella forsythia</i>	68.7 (9.7)	30.8 (11.2)	4.7 (4.7)	0.037
Enterococci susceptibility to Rifampicin				* <i>P</i> value
<i>Sanguinis streptococci</i>	74.6 (7.8)	83.0 (11.3)	49.4 (9.3)	0.045
Mean % of oral taxa	Enterococci susceptibility to Minocycline		† <i>P</i> value	
	S	I		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	55.7 (8.4)	1.8 (1.8)	0.026	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	59.8 (8.3)	20.2 (9.7)	0.037	
<i>Dialister pneumosintes</i>	59.0 (9.0)	20.2 (8.2)	0.039	
<i>Enterococcus faecalis</i>	55.9 (8.8)	19.0 (15.0)	0.028	
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	61.8 (8.8)	0	0.011	
<i>Helicobacter pylori</i>	48.2 (9.2)	8.4 (5.1)	0.041	
<i>Milleri streptococci</i>	70.9 (6.8)	40.3 (9.0)	0.036	

S=susceptible; I=intermediate; R=resistant. Significant difference in mean prevalence of each subgingival taxa among individuals with enterococci isolates presenting distinct susceptibility levels (\*Kruskal-Wallis and †Mann Whitney tests).

### **Additional References**

1. Socransky SS, Smith C, Martin L, Paster BJ, Dewhirst FE, Levin TE. "Checkerboard" DNA-DNA hybridization. *Biotech* 1994;17(4):788-792.
2. Heller D, Silva-Boghossian CM, do Souto RM, Colombo AP. Subgingival microbial profiles of generalized aggressive and chronic periodontal diseases. *Arch Oral Biol* 2012; 57(7):973-80.
3. Duprè I, Zanetti S, Schito AM, Fadda G, Sechi LA. Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy). *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 6):491-498.
4. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS Microbiol Lett* 2006;256(1):145-50.
5. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001;67(4):1628-35.
6. Pieniz S, Andrezza R, Anghinoni T, Camargo F, Brandelli A. Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s. *Food Control* 2014; 37, 251–256.
7. Nakayama J, Kariyama R, Kumon H. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine. *Appl Environ Microbiol* 2002;68(6):3152-5.



## 7. DISCUSSÃO

Com o avanço e desenvolvimento de métodos moleculares de detecção de microrganismos em diversos *habitats* no organismo humano, uma maior diversidade de espécies oportunistas tem sido observada na microbiota oral, em particular no biofilme subgengival (Paster *et al.*, 2001; 2006). Espécies microbianas de importância médica, normalmente associadas a infecções diversas no organismo humano tem sido descritas em proporções e níveis relativamente elevados em indivíduos com DP (Rams *et al.*, 1990; 1992; Colombo *et al.*, 2005; 2009; 2012; Ferraro *et al.*, 2007; Souto & Colombo, 2008a; 2008b; Fritschi *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009; Heller *et al.*, 2011; 2012; Artese *et al.*, 2012; Silva-Senem *et al.*, 2013; Silva-Boghossian *et al.*, 2011; 2014, Souto *et al.*, 2014). Apesar da cavidade oral servir como reservatório desses microrganismos patogênicos não orais, os mesmos ainda são considerados espécies meramente transitórias (Sedgley *et al.*, 1997; Gamboa *et al.*, 2013), e seu papel na etiopatogenia das DPs ainda é desconhecido.

Dentre essas espécies, destacam-se dois grupos relevantes, os BGN da família *Enterobacteriaceae*, e os enterococos, por exemplo, que são membros comuns do microbioma intestinal humano, implicados em várias doenças infecciosas. São conhecidos por apresentarem um grande arsenal de fatores de virulência e resistência a múltiplos antimicrobianos. Além disso, eles são capazes de se integrar e interagir com espécies orais dentro do biofilme dentário, podendo ser uma fonte de disseminação horizontal de genes de multirresistência para a comunidade microbiana bucal (Silva-Boghossian *et al.*, 2011; Thurnheer & Belibasakis, 2015).

Diversas pesquisas epidemiológicas mundiais relatam diferentes taxas de prevalência desses microrganismos na cavidade oral em indivíduos saudáveis (Sedgley & Samaranayake, 1974; Sedgley & Samaranayake, 1997; Campos & Zelante, 1978; Santos & Jorge, 1996; Sedgley *et al.*, 1996; Zaura *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Lourenço *et al.*, 2014). Entretanto, os estudos sobre a frequência de detecção dessas espécies no biofilme disbiótico subgengival associado à DP são limitados. Logo, uma investigação mais abrangente sobre as espécies de BGN e enterococos que colonizam o biofilme subgengival associado à DP e, mais importante, sobre sua susceptibilidade antimicrobiana e os mecanismos de resistência desses microrganismos na saúde oral e sistêmica é de extrema relevância no atual contexto de uma “Saúde Única” (WHO, 2017).

No presente estudo, uma prevalência geral de cerca de 40% de BGN no biofilme subgengival foi observada, com uma frequência significativamente aumentada na

periodontite (46.4%), corroborando os dados relatados na literatura (Barbosa *et al.*, 2001; Ardila *et al.*, 2012; Gamboa *et al.*, 2013; Souto *et al.*, 2014; Colombo *et al.*, 2016). No entanto, a prevalência desses microrganismos na microbiota oral ou periodontal varia amplamente na literatura de acordo com as diferentes populações estudadas, gravidade e classificação das DPs, técnicas de amostragem, bem como os métodos de identificação microbiana e análise (Ardila *et al.*, 2012; Gamboa *et al.*, 2013; Souto *et al.*, 2014). Em indivíduos norte-americanos, a frequência de BGN em indivíduos com periodontite foi de 14%, enquanto a mesma variou entre 60 e 90 % na Romênia, Sudão e Índia (Slots & Rams; 1990; Ali *et al.*, 1994; Ali *et al.*, 1996; Ranganathan *et al.*, 2017). A maior prevalência de BGN em diferentes regiões geográficas muitas vezes é atribuída à contaminação da água potável e/ou alimentos, higiene oral ineficiente, acesso limitado aos cuidados de saúde bucal, diferenças na composição do microbioma e sistema imune do hospedeiro (Slots & Rams, 1990; Ali *et al.*, 1994; Ali *et al.*, 1996; Ranganathan *et al.*, 2017), bem como a utilização massiva ou não controlada de antimicrobianos, que podem resultar no crescimento excessivo de microrganismos multirresistentes no microambiente subgingival (Ali *et al.*, 1994).

Em nosso estudo, uma maior diversidade de espécies de BGN foi encontrada em amostras de periodontite, incluindo as espécies *P. aeruginosa*, *E. cloacae*, *E. asburiae* e *K. pneumoniae*, como reportado em outros estudos (Slots & Rams, 1990; Barbosa *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2007; Ranganathan *et al.*, 2017; Arirachakaran *et al.*, 2019). Apesar do cultivo microbiano ter sido o método aqui utilizado, nosso grupo detectou frequências semelhantes para *P. aeruginosa* (30-50%) e *K. pneumoniae* (8-12%) no biofilme subgingival através de diferentes métodos moleculares (Silva-Boghossian *et al.*, 2011; Colombo *et al.*, 2002; Lourenço *et al.*, 2014; Souto *et al.*, 2014; Colombo *et al.*, 2009). *P. aeruginosa* é um importante patógeno oportunista associado a infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos e hospitalizados, bem como em indivíduos com doenças pulmonares obstrutivas crônicas e fibrose cística (Souto *et al.*, 2014; Arirachakaran *et al.*, 2019, Scannapocio *et al.*, 2003). Sua capacidade de formar biofilme sobre superfícies bióticas, como nos pulmões, e superfícies abióticas (tubos endotraqueais, catéteres) torna esta espécie resistente à resposta imune do hospedeiro e às terapias antimicrobianas, sendo esta a principal causa de mortalidade nesses pacientes (Lam *et al.*, 2012; Ewan *et al.*, 2015).

Já em relação aos *Enterococcus* spp., observamos uma baixa frequência (7,4%) de cepas isoladas de mais de 500 amostras do biofilme subgingival cultivadas, sendo

mais da metade delas identificadas como *E. faecalis* (53,7%). Comparações entre os nossos achados e os dados disponíveis na literatura devem levar em consideração diferenças metodológicas significativas entre os estudos, em particular os métodos de amostragem e técnicas de identificação utilizados. De maneira geral, frequências maiores de detecção de *Enterococcus* spp. são relatados por investigações que utilizaram métodos independentes de cultura ou amostras de saliva ou solução de enxágue oral (Colombo *et al.*, 2002; Sedgley *et al.*, 2004; Silva-Boghossian *et al.*, 2011; Souto & Colombo 2008; Rams *et al.*, 2013; Colombo *et al.*, 2016). Entretanto, enterococos orais são comumente detectados em menor prevalência quando o cultivo microbiano é usado (Rams *et al.*, 1992; Sedgley *et al.*, 2004; Salah *et al.*, 2008; Chindambar *et al.*, 2019). Rams e colaboradores foram capazes de isolar cerca de 6% de cepas de enterococos de um grande número de amostras de placa subgengival de pacientes com periodontite, enquanto outros pesquisadores relataram taxas de detecção em torno de 7% em bochechos de pacientes com doenças orais (Sedgley *et al.*, 2005; Salah *et al.*, 2008). Outros estudos, entretanto, também empregando cultivo microbiano, reportaram frequência mais elevadas no biofilme subgengival de uma população Indiana (26,8%), bem como em bochechos orais de uma coorte brasileira (16,6%) e saliva (21,8%) de Norte-americanos saudáveis. (Komiya *et al.*, 2016; Chindambar *et al.*, 2019). Apesar de termos utilizado meios seletivos para o isolamento dessas espécies de uma comunidade microbiana oral altamente diversificada, todas as amostras subgengivais também foram cultivadas em um meio rico não seletivo (BHI), de forma que as culturas negativas em meio de enterococcel foram repetidas para garantir a recuperação dessas espécies da cultura mista. Mesmo após a incubação e reinoculação, apenas 25% das amostras de biofilme subgengival apresentaram crescimento em meio seletivo. Destes, 29,9% foram posteriormente identificados como *Enterococcus* spp. Portanto, a variação nas taxas de detecção de enterococos pode ocorrer como resultado de diversos fatores, além das técnicas de detecção.

Independentemente da metodologia empregada, nossos achados concordam com a maioria das investigações que observaram uma maior taxa de isolamento/detecção de enterococos orais, principalmente *E. faecalis*, de indivíduos com DPs (G: 7,8% e P:9,8%) em relação aos pacientes com SP (2,2%). Da mesma forma, outros autores não detectaram ou detectaram números muito baixos de enterococos em pacientes com SP, mas relataram uma maior prevalência desses microrganismos (20-50%) em indivíduos com P (Colombo *et al.*, 2002; Souto & Colombo, 2008; Colombo *et al.*, 2016; Bhardwaj *et al.*, 2017;

Chidambar *et al.*, 2019). Enterococos orais são raros e transitórios na cavidade bucal de indivíduos saudáveis, e quando presentes em níveis mais elevados estão associados à má higiene oral, falha terapêutica e infecções orais (Zoletti *et al.*, 2006; Razavi *et al.*, 2007; Zehnder & Guggenheim, 2008; Balaei-Gajan *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011). Vale ressaltar que *E. faecalis* pode estar presente em diferentes camadas do biofilme dentário, interagindo com diferentes espécies orais (Johnson *et al.*, 2006; Thurnheer & Belibasakis, 2015). Além disso, *E. faecalis* apresenta a capacidade de formação de biofilme, adesão e invasão de células epiteliais gengivais e capacidade de sobreviver em células epiteliais num ambiente hostil como a bolsa periodontal (Subramanian & Mickel, 2009; Colombo *et al.*, 2013; La Rosa *et al.*, 2016; Ch'ng *et al.*, 2019).

Assim, mesmo sendo oportunistas transitórios na cavidade oral, a persistência de um biofilme disbiótico associado às DPs pode favorecer, a longo prazo, a colonização por esses patógenos, que direta ou indiretamente podem contribuir para o início, progressão e/ou recorrência de infecções orais. A produção de vários fatores de virulência e resistência a diversos antimicrobianos desses microrganismos podem justificar, em parte, sua alta ocorrência na DP, visto que podem induzir inflamação periodontal e destruição dos tecidos de suporte dentário, bem como se beneficiar da presença de produtos bacterianos e do hospedeiro disponíveis na bolsa periodontal (Barbosa *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2007; Silva-Boghossian *et al.*, 2011; Ardila *et al.*, 2012; Song *et al.*, 2013; Rams *et al.*, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2017; Najavi *et al.*, 2020).

De fato, interações sinérgicas e/ou antagônicas entre diversos microrganismos ocorrem constantemente dentro do biofilme subgengival, e tornam-se ainda mais complexas quando presentes numa microbiota disbiótica associada à periodontite (Barbosa *et al.*, 2001; Gonçalves *et al.*, 2007; Silva-Boghossian *et al.*, 2011).

Ao correlacionarmos a presença de enterococos com a composição da microbiota subgengival, observamos que a espécie *F. nucleatum* foi significativamente mais prevalente na microbiota subgengival de *Enterococcus* spp. positivos do que em indivíduos negativos. Ambas as espécies são conhecidas por interagirem com uma grande quantidade de espécies em infecções polimicrobianas associadas ao biofilme (Ch'ng *et al.*, 2019). A co-agregação de *F. nucleatum* com *E. faecalis* e estreptococos orais no biofilme parece ser seletiva e mediada por uma proteína hipotética conservada Aid1 (adesão induzida ao determinante 1), sugerindo que a expressão ou supressão desta proteína seja importante para o reconhecimento e discriminação por *F. nucleatum* de coco Gram-positivos específicos para interagir em diferentes estágios do desenvolvimento do

biofilme dentário (Kaplan *et al.*, 2014). Por outro lado, uma frequência significativamente baixa de *C. albicans* foi encontrada em indivíduos enterococos positivos, corroborando a relação de antagonismo entre essas espécies. Estudos têm demonstrado que a enterocina EntV inibe a morfogênese das hifas de *C. albicans* e a formação de biofilme, reduzindo sua patogenicidade em uma candidíase orofaríngea associada ao biofilme (Graham *et al.*, 2017). Também foi encontrada em nosso estudo uma baixa prevalência de um possível candidato a patógeno periodontal, *D. pneumosintes*, em pacientes que apresentavam enterococos carreadores do gene de biofilme em superfícies plásticas (*bopD+*), um fator essencial na formação do biofilme dentário (Di Rosa *et al.*, 2006). Em um estudo anterior, associamos a relação entre os patógenos periodontais e patógenos não orais com a gravidade da periodontite. Embora o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) tenha sido o principal preditor da periodontite avançada (anteriormente definida como periodontite agressiva), a co-agregação de Aa e *E. faecalis* foi relacionada à forma menos grave da doença (Silva-Boghossian *et al.*, 2011). Desta forma, *E. faecalis* pode atenuar ou aumentar a virulência de patógenos específicos dentro de biofilmes associados a diversas doenças, dependendo da pressão seletiva de determinantes ecológicos no microambiente. Por outro lado, a presença simultânea de Aa e *P. aeruginosa* vem sendo relacionada. Ardila e colaboradores (2012) descreveram uma relação sinérgica entre o patógeno periodontal Aa e *P. aeruginosa*. Dos 76 pacientes que apresentavam periodontite crônica em seu estudo, 20 apresentavam Aa e 18 *P. aeruginosa*, sendo que em 14 indivíduos possuíam ambas as espécies, correlações positivas entre a presença dessas espécies com os parâmetros clínicos periodontais também foram encontrados. Boghossian e colaboradores descreveram associações fortes entre bactérias não- orais e periodontopatógenos, sendo detectado *A. baumannii* em indivíduos com periodontite crônica e agressiva numa frequência mais elevada do que na saúde periodontal e gengivite. Algumas variáveis como idade, prevalência do complexo vermelho, presença de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* foram fortemente associadas à sítios com PS e NCI maiores que 5mm. Sendo a alta prevalência de Aa, *Acinetobacter*, complexo vermelho com *P. aeruginosa* associadas a forma mais agressiva da doença. Enquanto que uma alta frequência de Aa associado a presença de *E. faecalis* e associação com o complexo vermelho mais associado a forma crônica.

A interação desses patógenos oportunistas com espécies orais comensais e patogênicas no BD tem uma implicação clínica relevante, visto que níveis elevados desses microrganismos na bolsa periodontal pode aumentar o risco de disseminação para

o trato respiratório e corrente sanguínea em indivíduos imunodeficientes e hospitalizados (Navazesh & Mulligan, 1995; Ewan *et al.*, 2015). Além disso, muitos desses microrganismos são capazes de carrear e facilmente transferir genes de resistência para outras espécies do BD, comprometendo o tratamento de infecções orais e sistêmicas com antimicrobianos. Nossos resultados demonstraram que cerca de 60% dos isolados de BGN de todos os grupos clínicos periodontais apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida (intermediária) a um ou mais antimicrobianos. A maioria dessas espécies da família *Enterobacteriaceae* foi resistente às cefalosporinas de primeira e segunda gerações, bem como à amoxicilina-clavulanato, um antimicrobiano amplamente utilizado na área odontológica. Porém, apenas uma cepa de *K. pneumoniae* isolada de periodontite foi resistente à ciprofloxacina e imipenem. Achados semelhantes foram relatados por diversos autores que investigaram essas espécies em amostras da população brasileira de diferentes regiões do país. Gaetti-Jardim *et al.* (2010) analisaram amostras de saliva, placa dentária e mucosa de indivíduos com diversas afecções periodontais e edêntulos. Taxas similares de BGN resistentes à amoxicilina-clavulanato (42%) e cefalotina (34%), geralmente produtores de beta-lactamases, e baixa resistência à amicacina, gentamicina, ciprofloxacina e imipenem foram reportados. Barbosa *et al.* (2001) também identificaram uma alta susceptibilidade à ciprofloxacina, entretanto uma taxa de resistência muito maior à amoxicilina-clavulanato (70%) em bastonetes entéricos, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* spp. de lesões de periodontite foi encontrada. Em outro estudo, além da elevada resistência à amoxicilina-clavulanato (57,8%) e cefoxitina (45,3%), os autores reportaram um número elevado de multirresistência (48%) em cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas da cavidade oral de profissionais de saúde e trabalhadores de um hospital (Leão-Vasconcelos *et al.*, 2015). Da mesma forma, Gonçalves *et al.* (2007) identificaram altos níveis de resistência à amoxicilina-clavulanato (81%) e multirresistência de bastonetes entéricos (50%) isolados de bolsas periodontais, apesar da baixa prevalência de *Enterobacteriaceae* (20%).

Em contraste a esses achados, detectamos uma baixa prevalência de multirresistência aos antimicrobianos testados para BGN (4,6%) de acordo com o CLSI. Curiosamente, as poucas cepas multirresistentes foram isoladas de pacientes com histórico médico de internações hospitalares e/ou terapia antimicrobiana previamente à entrada no estudo. Uma cepa de *K. pneumoniae* resistente ao imipenem no teste de susceptibilidade antimicrobiana e com hidrólise positiva aos carbapenêmicos foi encontrada, entretanto, este isolado não apresentava nenhum dos genes codificadores de

ESBL e carbapenemases pesquisados, de acordo com os achados de Leão-Vasconcelos e colaboradores (2015). Em um estudo piloto, a produção de ESBL por *Enterobacteriaceae* de biofilme dental de indivíduos saudáveis, porém portadores fecais dessas bactérias foi um achado incomum. Por outro lado, outros autores relataram altos números de BGN orais e não orais produtores de várias  $\beta$ -lactamases e portadores de vários genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Gaetti-Jardim *et al.*, 2010; Dupin *et al.*, 2015). Embora o fenótipo positivo de ESBL e a redução da sensibilidade ao imipenem seja sugestiva da presença de carbapenemases e ESBL, nem sempre os genes codificadores dessas enzimas são detectados (Bratu *et al.*, 2005; Meyer *et al.*, 2011). Assim, é possível que outros mecanismos de resistência a esses antimicrobianos ocorram, como a combinação de ESBL ou AmpCs, que são cefalosporinases capazes de hidrolisar vários  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> geração, aztreonam, além de hidrolisarem pobremente cefalosporinas de quarta geração, como, cefepima e os carbapenens. Além de mutações nas porinas, que são proteínas presentes na membrana celular externa de lipopolissacarídeos de BGN responsáveis pela permeabilidade celular (Bradford *et al.*, 1997; Pasteran *et al.*, 2009).

Similarmente aos isolados de BGN, 64.3% das cepas de enterococos do presente estudo apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Apenas 11% dos isolados foram sensíveis a todos antimicrobianos testados, e muito poucas cepas apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária à ampicilina, vancomicina, minociclina e cloranfenicol. No entanto, foram observadas altas taxas (>55%) de enterococos com baixa susceptibilidade e/ou resistência à ciprofloxacina (68%), eritromicina (82%) e rifampicina (57%), enquanto cerca de 29% dos isolados apresentaram baixa sensibilidade a doxiciclina. A maioria dos estudos que testaram susceptibilidade antimicrobiana de enterococos orais também mostraram baixa ou nenhuma resistência a penicilinas, vancomicina e cloranfenicol (Rams *et al.*, 1992; Sedgley *et al.*, 2004; Di Rosa *et al.*, 2006; Salah *et al.*, 2008; Dahlén *et al.*, 2012; Komiyama *et al.*, 2016), com exceção de Brardwaj e colaboradores que relataram 13.3% de resistência à vancomicina na Índia e Gaetti-Jardim *et al.* que observaram altas taxas de resistência às penicilinas (30%) e cloranfenicol (47%) em amostras orais de brasileiros com DPs. Já a elevada resistência de enterococos orais a tetraciclinas (25-54%) e eritromicina (29-43%) é descrita por diversos autores (Rams *et al.*, 1992; Sedgley *et al.*, 2004; Di Rosa *et al.*, 2006; Salah *et al.*, 2008; Dahlén *et al.*, 2012; Komiyama *et al.*, 2016). No entanto, apenas 2 estudos detectaram enterococos orais com taxas de

resistência à eritromicina (80-100%) semelhantes aos nossos achados (Rams *et al.*, 1992; Anderson *et al.*, 2016). Além disso, nenhuma investigação relatou alta prevalência de enterococos orais com baixa sensibilidade ou resistência à ciprofloxacina e rifampicina como por nós observada (Sedgley *et al.*, 2004; Salah *et al.*, 2008; Gaetti-Jardim *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2016). Resistência ou baixa sensibilidade à ciprofloxacina, quando detectada, variou entre 9 a 13% (Rams *et al.*, 1992; Di Rosa *et al.*, 2006; Rams *et al.*, 2013; Bhardwaj *et al.*, 2017).

Essa alta taxa de resistência de espécies de *Enterobacteriaceae* e enterococos na placa subgingival, principalmente a antimicrobianos das classes das penicilinas, cefalosporinas, tetraciclina, quinolona e macrolídeos tem implicações clínicas importantes, visto que esses antimicrobianos estão entre os antibióticos mais prescritos na clínica odontológica, e também são empregados como adjuvantes do tratamento periodontal mecânico (Oberai *et al.*, 2015; Rams *et al.*, 2013). Além disso, os enterococos possuem uma alta taxa de transferência horizontal de genes de resistência a antimicrobianos dentro dos biofilmes, particularmente com bactérias orais na placa dentária (Sedgley *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, o crescente aumento da resistência microbiana a várias substâncias é alarmante, pois está diretamente relacionado ao uso excessivo ou incorreto de agentes de amplo espectro, à falta de um controle de antimicrobianos no ambiente ambulatorial e hospitalar, bem como ao resultado da pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos fora da área médica, como na medicina veterinária, alimentação animal, agricultura e produção de peixe (Prestinaci *et al.*, 2015; Holmes *et al.*, 2016; Chaudhry *et al.*, 2019). Na odontologia, o uso de antimicrobianos está sendo cada vez mais controlado. As diretrizes para a prevenção de endocardite infecciosa e infecções articulares protéticas foram revisadas em 2007 e 2012 e mudanças foram sugeridas (Wilson *et al.*, 2007; Suda *et al.*, 2019). Essas revisões concluíram que havia evidência insuficiente sobre a eficácia da profilaxia antibiótica associada à endocardite, infecções articulares e atendimento odontológico. Atualmente, os antimicrobianos para profilaxia são recomendados, de acordo com as novas diretrizes, para pacientes com doenças cardíacas de alto risco submetidos a procedimentos odontológicos invasivos (Wilson *et al.*, 2007; Suda *et al.*, 2019). O controle do uso empírico, principalmente a nível ambulatorial, e em populações com baixo acesso à tratamento dental de qualidade, é primordial na prevenção de seleção de espécies multirresistentes em reservatórios como o BD, mucosa oral e dorso da língua.



A participação dessas espécies não orais nas DP e outras doenças orais disbióticas, como a cárie e mucosite oral, ainda é desconhecida, provavelmente pela complexidade das interações que ocorrem no BD associado à doença em diferentes indivíduos. Certamente, esses microrganismos apresentam vários fatores de virulência relacionados à colonização, invasão tecidual, formação de biofilme, evasão do hospedeiro e persistência no local infectado que são compatíveis com a patogênese das DP (Franz *et al.*, 2003; Franz *et al.*, 2011). Dos genes codificadores de fatores de virulência em enterococos, observamos uma alta prevalência de *ace* (64.3%), *asa* (39.3%) e *esp* (35.7%), os quais são os principais componentes da superfície do enterococos responsáveis pela ligação às proteínas da matriz extracelular (colágeno e laminina), invasão celular e formação do biofilme (Anderson *et al.*, 2016; Ch'ng *et al.*, 2019; Najafi *et al.*, 2020). Três fatores de virulência também relacionados à capacidade dos enterococos em formar biofilme (*gelE*, *bopD*, *efl841/fsrFsrC*) e promover degradação dos componentes do hospedeiro (*gelE*) foram detectados em 32.1% dos isolados. Outros autores encontraram frequências ainda maiores desses genes em enterococos orais de infecções mucosas, endodônticas e periodontais (Singh *et al.*, 2010; Zoletti *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Dahlén *et al.*, 2012; Bhatti *et al.*, 2015; Anderson *et al.*, 2016; Barbosa-Ribeiro *et al.*, 2016; Akbari Aghdam *et al.*, 2017). Já os genes *asa373* e *cylA*, responsáveis pela colonização e lise das células imunes (evasão da resposta imune do hospedeiro) não foram detectados em nenhuma cepa isolada, conforme relatado em alguns estudos (Akbari Aghdam *et al.*, 2017; Graham *et al.*, 2017).

Embora a formação de biofilme, atividades hidrolíticas de gelatinase e hemolisinas não foram aqui avaliados através de métodos fenotípicos, mais de 66% das cepas de *bopD*<sup>+</sup> também eram *ace*<sup>+</sup>, *asa*<sup>+</sup> e *esp*<sup>+</sup>, reforçando a associação desses genes com capacidade aumentada de formação de biofilme (Anderson *et al.*, 2016; Akbari Aghdam *et al.*, 2017; Di Rosa *et al.*, 2006). Em contraste, apenas 3 das 9 cepas *bopD*<sup>+</sup> eram *gelE*<sup>+</sup>. O fenótipo gelatinase normalmente encontra-se associado a uma enzima endopeptidase codificada pelo cluster de gene *Efl841/fsrFsrC* (Di Rosa *et al.*, 2006). Seis das 9 cepas positivas para *Efl841/fsrFsrC* eram *gelE*-negativas, confirmando um possível fenótipo negativo. Já o gene de antígeno da endocardite (*efaA*) é comumente expresso em enterococos orais, entretanto, apenas 5 de nossos isolados foram positivos para esse gene (Sedgley *et al.*, 2004; Zoletti *et al.*, 2011; Dahlén *et al.*, 2012). De maneira geral, 57% das 28 cepas de enterococos apresentaram 2 ou mais genes relacionados com os fatores de virulência testados. Associações entre a presença ou ausência dos genes *esp*, *asa*,

*bopD*, *efaA* e *Ef1841/fsrC* foram significativas, sugerindo possíveis mecanismos regulatórios entre esses fatores. A ausência do gene *esp* parece estar relacionada à ausência de *bopD*, *efaA* e *Ef1841/fsrC*. A presença de genes de virulência únicos ou múltiplos em enterococos subgengivais pode certamente contribuir para a patogênese das DPs, bem como representar um risco potencial para endocardite infecciosa após a terapia periodontal convencional no caso da presença do gene *efaA* (Najafi *et al.*, 2020).

Apesar não termos avaliado fatores de virulência específicos nas cepas orais de BGN, estes microrganismos apresentam inúmeros fatores de virulência relacionados a atividades enzimáticas hidrolíticas, como gelatinase, lecitinase, caseinase, elastase, envolvidas na destruição de matrizes extracelulares de colágeno, reforçando uma possível contribuição na patogênese da DP. Além de serem microrganismos constituídos de LPS, uma endotoxina que lhes confere patogenicidade e virulência, determinando efeitos biológicos que resultam no processo inflamatório (Sedgley & Samaranayake, 1994; Plésiat & Nikaido, 2002).

Desta forma, podemos observar que o BD fornece um ambiente favorável e propício para a transferência genética de genes de resistência, bem como expressão de fatores de virulência, entre BGN e enterococos com espécies orais comensais ou patogênicas, que por sua vez podem limitar a eficácia da terapia periodontal e de possíveis terapias com antimicrobianos para tratamento de outras infecções do organismo, como otites, sinusites, faringites. Indivíduos com DP podem carrear níveis elevados dessas espécies na cavidade oral, podendo se tornar verdadeiras fontes de infecção e reinfecção com espécies resistentes para si próprios, outros indivíduos e para o meio ambiente. Essa disseminação sistêmica com foco de origem na cavidade bucal pode ser ainda mais evidente em indivíduos com higiene oral deficiente, pacientes hospitalizados e imunossuprimidos (Ewan *et al.* 2015). Portanto, medidas preventivas e terapêuticas para o controle do biofilme subgengival associado às DPs devem ser implementadas rotineiramente a fim de se eliminar ou prevenir possíveis focos infecciosos orais com microrganismos resistentes e virulentos com potencial de disseminação sistêmica e comprometimento da saúde geral dos indivíduos.

## 8 CONCLUSÃO

Uma alta prevalência de BGN é observada no biofilme subgingival, porém *Enterococcus* spp. (*Enterococcus faecalis*) são detectados com baixa frequência. Entretanto, no biofilme subgingival associado à periodontite, ambos os grupos de microrganismos estão presentes em alta prevalência em relação a pacientes com SP.

Altas taxas de resistência/sensibilidade reduzida a antimicrobianos de uso rotineiro na prática Odontológica são detectadas nessas espécies, bem como fatores de virulência compatíveis com a patogênese das DPs.

Correlações específicas entre a presença dessas espécies, sua susceptibilidade a antimicrobianos e virulência com espécies da microbiota subgingival estão presentes no biofilme subgingival, reforçando a complexa rede de interações entre os membros dessas comunidades, incluindo a possibilidade de transferência de genes de resistência e aumento da virulência. Além da implicação dessas espécies na saúde periodontal, as mesmas podem representar um risco ao desenvolvimento ou progressão de outras infecções do organismo humano, em particular em indivíduos imunodeprimidos ou com doenças crônicas de base.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D. **Diagnosis and treatment of refractory periodontitis.** *Periodontology and Restorative Dent.*, 2, 33-38, 1992.
- ADLER, A.; GNIADKOWSKI, M.; BARANIAK, A.; et al **Transmission dynamics of ESBL-producing Escherichia coli clones in rehabilitation wards at a tertiary care centre.** *Clin. Microbiol. Infect.*, 18, E497-505, 2012.
- AKBARI AGHDAM, M.; SOROUSH BARHAGHI, M.H.; AGHAZADEH, M.; et al. **Virulence genes in biofilm producer Enterococcus faecalis isolates from root canal infections.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 63(5):55-59, 2017.
- AKL, E.A.; GADDAM, S.; GUNUKULA, S.K.; HONEINE, R.; JAOUDE, P.A.; IRANI, J. **The effects of waterpipe tobacco smoking on health outcomes: a systematic review.** *Int J Epidemiol.*, 39(3), 834-57, 2007.
- ALBANDAR, J. M. **Periodontal diseases in North America.** *Periodontology 2000*, 29, 3169, 2002.
- ALI, R.W.; BAKKEN, V.; NILSEN, R.; SKAUG, N. **Comparative detection frequency of 6 putative periodontal pathogens in Sudanese and Norwegian adult periodontitis patients.** *J Periodontol.*, 65, 1046–1052, 1994.
- ALI, R.W.; VELCESCU, C.; JIVANESCU, M.C.; LOFTHUS, B.; SKAUG, N. **Prevalence of six putative periodontal pathogens in subgingival plaque samples From Romanian adult periodontitis patients.** *J Clin Periodontol.*, 23, 133–139, 1996.
- ANDERSEN, J. **Quantification of DNA by slot-blot analysis.** *Methods Mol Biol.*, 98:33-8, 1998.
- ANDERSON, A.C.; JONAS, D.; HUBER, I.; et al. **Enterococcus faecalis from Food, Clinical Specimens, and Oral Sites: Prevalence of Virulence Factors in Association with Biofilm Formation.** *Front Microbiol.*, 6, 1534, 2016.
- ANVISA. **Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária., 2004.
- ARAVINDHAN, T.R.; RANGANATHAN, S.S.; CHITRAA, R.C.; KANNAN, I. **Subgingival prevalence rate of enteric rods in subjects with periodontal health and disease.** *Journal of Indian Society of Periodontology*, 21 (3), 224-8, 2017.
- ARDILA, C.M.; ALZATE, J.; GUZMÁN, I.C. **Relationship between gram negative enteric rods, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, and clinical parameters in periodontal disease.** *J Indian Soc Periodontol.*, 16, 65-9, 2012.
- ARMITAGE, G. C. **Development of a classification system for periodontal diseases and conditions.** *Annals of Periodontology*, 4, 1-6. 1999.
- ARMITAGE, G.C. **Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis.** *Periodontol 2000*, 53, 70–88, 2010.
- ARTESE, H.P.; SOUSA, C.O.; TORRES, M.C.; SILVA-BOGHOSSIAN, C.M.; COLOMBO, A.P. **Effect of non-surgical periodontal treatment on the subgingival microbiota of patients with chronic kidney disease.** *Braz Oral Res.*, 26(4), 366-372, 2012.

- AUCKEN, H.M.; PITT, T.L. **Antibiotic resistance and putative virulence factors of *Serratia marcescens* with respect to O and K serotypes.** J Med Microbiol., 47, 1105-1113, 1998.
- BAELUM, V. & SCHEUTZ, F. **Periodontal diseases in Africa.** Periodontology 2000., 79-103, 2002.
- BALAEI-GAJAN, E.; SHIRMOHAMMADI, A.; ABASHOV, R.; AGAZADEH, M.; FARAMARZIE, M. **Detection of enterococcus faecalis in subgingival biofilm of patients with chronic refractory periodontitis.** Med Oral Patol Oral Cir Bucal.,15(4), e667-70,2010.
- BARBOSA, F.C.B.; MAYER, M.P.A.; SABA-CHUJFI, E.; CAI, S. **Subgingival occurrence and antimicrobial susceptibility of enteric rods and pseudomonas from Brazilian periodontitis patients.** Oral Microbiol Immunol.,16,306–310, 2001.
- BARBOSA J., FERREIRA V., TEIXEIRA, P. **Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented.** Food Microbiology., 26(5),527-532,2009.
- BARBOSA-RIBEIRO M, DE-JESUS-SOARES A, ZAIA AA, FERRAZ CC, ALMEIDA JF, GOMES BP. **Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of Enterococcus faecalis Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment.** J Endod.,42(7),1022-8, 2016.
- BARSIC, B.; TAMBIC, A.; SANTINI, M.; KLINAR, I.; KUTLESA, M.; KRAJINOVIC, V. **Antibiotic resistance among nosocomial isolates in a Criatin intensive care unit results of a twelve- year focal surveillance of nosocomial infections.** J chemother.,16(3),273-81,2004.
- BARTOLD, P.M.; VAN DYKE, T.E. **Periodontitis: a host-mediated disruption of microbial homeostasis. Unlearning learned concepts.** Periodontol 2000.,62(1), 203–217, 2013.
- BHATTY, M.; CRUZ, M.R.; FRANK, K.L.; et al. **Enterococcus faecalis pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance) and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation and virulence.** Mol Microbiol., 95(4),660-77, 2015.
- BBC BRASIL. **Superbactérias avançam no Brasil e levam autoridades de saúde a correr contra o tempo.** Disponível em: [http://www.bbc.com/portuguese/brasil\\_40561948](http://www.bbc.com/portuguese/brasil_40561948). Acesso em 20/08/2019.
- BEIKLER, T.; FLEMING, T.F. **Oral biofilme-associated diseases: trends and implications for quality of life, systemic health and expenditures.** Periodontol 2000.,55,87-103,2011.
- BETRIU, C.; SÁNCHEZ, A.; PALAU, M.L.; GÓMEZ, M.; PICAZO, J.J. **Antibiotic Resistance surveillance of *Stenotrophomonas maltophilia*, 1993-1999.** Antimicrob Chemother.,48(1)15-24, 2001.
- BHARDWAJ, S.B.; MEHTA, M.; SOOD, S.; SHARMA, J. **Biofilm Formation by Drug Resistant Enterococci Isolates Obtained from Chronic Periodontitis Patients.** J Clin Diagn Res.,11(1), DC01-DC03, 2017.
- BLAIR, J. M. et al. **Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance.** Nature.,13,42-51, 2015.

- BODEY, G.P.; BOLIVAR, R.; FAINSTAIN, V.; JADELA, L. **Infections caused by *Pseudomonasaeruginosa***. Rev Infect Dis.,5, 279–313,1983.
- BONNET, V.; DUPONT, H.;GLORION, S.;AUPÉE, M.; KIPNIS, E.;GÉRARD, J.;HANOUZ, J.;Fischer, M. **Influence of bacterial resistance on mortality in intensive care units: A registry study from2000 to 2013(IICU Study)**. Journal of Hospital Infection J.,102(3),317-324,2019
- BRADFORD, P.A. **Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat**. Rev. Clin Microbiol.,14(4),933-951,2001.
- BRATU, S.; MOOTY, M.; NICHANI ,S.; et al. **Emergence of KPC-possessing Klebsiella pneumoniae in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection**. Antimicrob Agents Chemother.,49(7),3018-3020,2005.
- BROOK, L. **Aerobic and anaerobic bacteriology of purulent nasopharyngitis in children**. J. Clin. Microbiol.,26(3),592-4,1988.
- BROWN S, AMYES S. **OXA b-lactamases in Acinetobacter: the story so far**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.,57,1-3,2006.
- BURNETT, G.W.; SCHERP, H.W. **Bacteriologic studies of the advancing dentinal lesion**. J Dent Rest.,30,766-777,1951.
- CACCI, L.C. **Estudo epidemiológico-molecular das infecções por Pseudomonas aeruginosa resistente ao imipenem em pacientes hospitalizados**. Dissertação (Mestrado em Ciências)- São Paulo, 75 f., Universidade Estadual de Campinas, 2007.
- CAMPOS, C.M.; ZELANTE, F. **Contribuição ao estudo da microbiota bucal humana. Ocorrência de enterobactérias na saliva, língua e placa dental**. Rev Fac Odontol São Paulo.,16,77–86,1978.
- CARLOS,A.R.; SEMEDO-LEMSADDEK,T.; BARRETO-CRESPO M.T.; TENREIRO, R. **Transcriptional analysis of virulence-related genes in enterococci from distinct origins**. Journal of Applied Microbiology.,108,1563-1575,2010.
- CATON, J.; ARMITAGE, G.; BERGLUNDH, T. et al. **A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions – Introduction and key changes from the 1999 classification**. J Periodontol.,89(1),S1–S8,2018.
- CHAPPLE, I.L.C.; MEALEY, B.L.; et al. **Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Pero-Implant Diseases and Conditions**. J Periodontol.,89(1), S74-S84,2018.
- CHEN, T.;YU, W.H.; IZARD, J.;BARANOVA, O.V.;LAKSHMANAN, A.; DEWHIRST, F.E. **The Human Oral MicrobiomeDatabase: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information**. Oxford.,6, baq013, 2010.
- CH'NG, J.; CHONG, K.K.L.; LAM, L.N. *et al.* **Biofilm-associated infection by enterococci**. Nat Rev Microbiol.,17(2),82–94,2019.
- CHIDAMBAR CK, SHANKAR SM, RAGHU P, GURURAJ SB, BUSHAN KS. **Detection of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilms of healthy, gingivitis, and chronic periodontitis subjects**. J Indian Soc Periodontol.,23(5),416-418,2019.

- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 23rd informational supplement** CLSI document M100-S27 Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2018.
- COSTERTON, J.W.; COOK, G.; LAMONT, R. **The community architecture of biofilms: dynamic structures and mechanisms.** In: Newman HN, Wilson M, editors. Dental plaque revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. Cardiff: Boline, 5-14, 1999.
- COELHO, J.; WOODFORD, N.; TURTON, J.; LIVERMORE, D.M. **Multiresistant Acinetobacter in the UK: how big a threat?** Journal of hospital infection., 58, 167-169, 2004.
- COLOMBO, A.P.; HAFFAJEE, A.D.; DEWHIRST, F.E. **Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects.** J.Clin.Periodontol., 25, 169-180, 1998.
- COLOMBO, A. P.; TELES, R. P.; TORRES, M. C.; ROSALEM, W.; MENDES, M. C.; SOUTO, R. M.; UZEDA, M. **Effects of non-surgical mechanical therapy on the subgingival microbiota of Brazilians with untreated chronic periodontitis: 9-month results.** Journal of Periodontology., 76, 778–784, 2005.
- COLOMBO, A.P.V.; BOCHES, S.K.; COTTON, S.L.; GOODSON, J.M.; KENT, R.; SOCRANSKY, S.S.; HASTURK, H.; VANDYKE, T.E.; DEWHIRST, F.; PASTER, B.J. **Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis and periodontal health using the human oral microbe identification microarray.** J Periodontol., 80(9), 1421-1432, 2009.
- COLOMBO, A. P. V.; BENNET, S.; COTTON, S.L.; GOODSON, J.M.; KENT, R.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; HASTURK, H.; VAN DYKE, T.E.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J. **Impact of Periodontal Therapy on the Subgingival Microbiota of Severe Periodontitis: Comparison between Good Responders and Refractory Subjects by the Human Oral Microbe Identification Microarray (HOMIM).** Journal of Periodontology., 83, 1279-1287, 2012.
- COLOMBO, A.P.V.; MAGALHÃES, C.B.; HARTENBACH, F.A.R.R.; SOUTO, R.M.; SILVA-BOGHOSSIAN, C.M. **Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance.** *Microb Pathog*, 94:27-34, 2016.
- COSTA, A.L.P.; ANTONIO SILVA JUNIOR, C.S. **Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura.** UNIFAP., 7(2), 2017.
- CRETI, R.R.; VENDITTI, M.; D'AMELIO, R.; ARCIOLA, C.R.; MONTANARO, L.; BALDASSARRI, L. **Relationship between biofilm formation, the enterococcal Surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.** FEMS Microbiology Letters., 256(1), 145-150, 2004.
- DAHLÉN, G.; BLOMQUIST, S.; ALMSTÅHL, A.; CARLÉN, A. **Virulence factors and antibiotic susceptibility in enterococci isolated from oral mucosal and deep infections.** J Oral Microbiol., 4(10), 2012.
- DEWHIRST, F.E.; CHEN, T.; IZARD, J.; PASTER, B.J.; TANNER, A.C.; YU, W.H. **The human oral microbiome.** J Bacteriol., 192(19), 5002–5017, 2010.

- DIENSTMANN, R. et al. **Avaliação fenotípica da enzima Klebsiella Pneumoniae carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar.** J. Bras. Patol. Med. Lab.,46(1),23-27,2010.
- DUPIN, C.; TAMANAI-SHACOORI, Z.; EHRMANN, E.; et al. **Oral Gram-negative anaerobic bacilli as a reservoir of  $\beta$ -lactam resistance genes facilitating infections with multiresistant bacteria.** Int J Antimicrob Agents.,45(2),99-105, 2015.
- DUPRE, I.; ZANETTI, S.; SCHITO, A. M.; FADDA, G.; SECHI, L. A. **Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates collected in Sardinia (Italy).** J Med Microbiol.,52,491–498,2003.
- DYE, B.A. **Global periodontal disease epidemiology.** Periodontol 2000.,58(1) 10-25,2012.
- EATON, T.J.; GASSON, M.J. **Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchanges between food and medical isolates.** Appl Environ Microbiol.,67,1628-1635,2001.
- ELSNER, H-A.; SOBOTTKA, I.; MARCK, M.; CLAUSSEN, M.; LAUFS, R.; WIRTH, R. **Virulence factors of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* blood culture isolates.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis.,19,39-42,2000.
- ESTRELA, T.S. **Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira.** Assessoria de assuntos internacionais e Saúde, Ministério da Saúde,307-327,2018.
- EWAN, V.C.; SAILS, A.D.; WALLS, A.W.G.; RUSHTON, S.; NEWTON, J.L. **Dental and microbiological risk factors for hospital-acquired pneumonia in non-ventilated older patients.** PLoS ONE.,10,e0123622, 2015.
- FERRARO, C.T.; GORNIC, C.; BARBOSA, A.S.; PEIXOTO, R.J.; COLOMBO, A.P. **Detection of *Dialister pneumosintes* in the subgingival biofilm of subjects with periodontal disease.** Anaerobe.,13(5-6),244-248,2007.
- FIGUEIREDO-MENDES, C. M. et al. ***Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units.** Enferm Infecc Microbiol Clin.,23(7),402-405,2005.
- FINE, D.H. **Microbial identification and antibiotic sensitivity testing, an aid for patients refractory to periodontal disease.** J Clin Periodontol.,21,98-106,1994.
- FRITSCHI, B.Z.; ALBERT-KISZELY, A.; PERSSON, G.R. ***Staphylococcus aureus* and other bacteria in untreated periodontitis.** J. Dent. Res.,87(6),589-93,2008.
- FOULQUIE MORENO, M. R., SARANTINOPOULOS, P., TSAKALIDOU, E. & DEVUYST, L. **The role and application of enterococci in food and health.** Int J Food Microbiol.,106,1–24,2006.
- FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; HEINZSCHLEIFER, K.<sup>C</sup>; HOLZAPFEL W.H. **Enterococci in foods—a conundrum for food safety.** International Journal of Food Microbiology.,88(1-2),105-122,2003.
- FRANZ, C.M.A.P.; HIKZAPFEL, W.H. **Emerging foodborne pathogens.** New Yorker: CRC Press.,557-613,2006.



- FRANZ, C.M.A.P.; HUCH, M.; ABRIOUEL,H.; HOLZAPFEL,W.; GÁLVEZ,A.  
**Enterococci as probiotics and their implications in food safety.**International Journal of Food Microbiology.,151(2),125-140,2011.
- GAETTI-JARDIM, E.C.; MARQUETI, A.C.; FAVERANI, L.P.; GAETTI-JARDIM, E. JR.  
**Antimicrobial resistance of aerobes and facultative anaerobes isolated from the oral cavity.** Appl Oral Sci.,18(6),551-9,2010.
- GAMBOA, F.; GARCÍA, D.A.; ACOSTA, A.; MIZRAHI, D.; PAZ, A.; MARTÍNEZ, D. *et al.*  
**Presence and antimicrobial profile of gram-negative facultative anaerobe rods in patients with chronic periodontitis and gingivitis.** Acta Odontol Latinoam.,26,24-30,2013.
- GIRAFFA,G. **Enterococci from foods.** FEMS Microbiology Reviews.,26(2),163–171, 2002.
- GOLD, O.G.; JORDAN, H.V.; VAN HOUTE, J. **The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models.** Arch Oral Biol.,20, 473-477,1975.
- GLOBAL ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (GLASS)**report: early implementation 2017.** World Health Organization,2018.
- GONÇALVES, M.O.; COUTINHO-FILHO, W.P.; PIMENTA, F.O.; PEREIRA, G.A.;PEREIRA, J.A.A.; MATTOS-GUARALDI, A.L.; HIRATA, R. Jr.  
**Periodontal diseases reservoir for multi-resistant and hydrolytic enterobacterial species.** Letters in Applied Microbiology.,44,488–494,2007.
- GRAHAM, C.E.; CRUZ, M.R.; GARSIN, D.A.; LORENZ, M.C. *Enterococcus faecalis* bacteriocin EntV **inhibits hyphal morphogenesis, biofilm formation, and virulence of *Candida albicans*.** Proc Natl Acad Sci U S A.,114(17),4507-4512, 2017.
- HAFFAJEE, A.D.; ROBERTS, C.; MURRAY, L.; VEIGA, N.; MARTIN, L.; TELES,R.P.;et al. **Effect of herbal, essential oil, and chlorhexidine mouthrinses on the Composition of the subgingival microbiota and clinical periodontal parameters.** J ClinDent.,20(7),211-217,2009.
- HAJISHENGALLIS, G.; LAMONT, R.J. **Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontaldisease etiology.** Mol Oral Microbiol.,27(6),409-19,2012.
- HÉRITIER, C.; POIREL, L.; LAMBERT, T.; NORDMANN, P. **Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy.,49,3198-3202, 2005.
- HELLER, D.; VARELA, V.M.; SILVA-SENE, M.X.; TORRES, M.C.; FERES-FILHO,E.J.; COLOMBO, A.P. **Impact of systemic antimicrobials combined with anti-infective mechanical debridement on the microbiota of generalized aggressive periodontitis: a 6-month RCT.** J Clin Periodontol.,38(4),365-364,2011.
- HELLER, D.; SILVA-BOGHOSSIAN, C.M.; SOUTO, R.M.; COLOMBO,A.P. **Subgingival microbial profiles of generalizes aggressive and chronic periodontaldiseases.** Arch Oral Biol.,57(7),973-980,2012.

- HENDERSON, B.; WARD, J.M.; READY, D. **Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans: a triple A\* periodontopathogen?** *Periodontol* 2000.,54, 78–105,2010.
- HOIBY, N.; BJARNSHOLT, T.; GIVSKOV, M.; MOLIN, S.; CIOFU, O. **Antibiotic resistance of bacterial biofilms.***Int. J. Antimicrob. Agents.*,35,322-332,2010.
- HOLMES, A.H.; MOORE, L.S.P.; SUNDSFJORD, A.; et al. **Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance.** *The Lancet.*, 387(10014),176-187,2016.
- JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. **Extended Broad-Spectrum  $\beta$ -Lactamases Conferring Transferable Resistance to Newer  $\beta$ -Lactam Agents in Enterobacteriaceae: Hospital Prevalence and Susceptibility Patterns.** *Reviews of Infectious Diseases.*,10(4),867-878,1998.
- JETT, B.D.;HUYCKE, M.M.;GILMORE, M.S.**Virulence of enterococci.***Clin Microbiol Reviews.*,7,462-478,1994.
- KAPLAN, A.; KAPLAN, C.W.; HE, X.; MCHARDY, I.; SHI, W.; LUX, R. **Characterization of aid1, a novel gene involved in Fusobacterium nucleatum interspecies interactions.** *Microb Ecol.*,68(2),379-87,2014.
- KILIAN, M.; FRANDBSEN, E.V.; HAUBEK, D.; POULSEN, K. **The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis.** *Periodontol* 2000., 42,158–179,2006.
- KIM, Y.J.; VIANA, A.C.; SCAREL-CAMINAGA, R.M. **Influences of genetic factors in the etiopathogenesis of periodontal disease.** *Rev Odontol UNESP.*,36(2),175-180,2007.
- KINANE, D.F.; STATHOPOULOU, P.G.; PAPAPANOU, P.N. **Periodontal diseases.** *Nat Rev Dis Primers.*,22(3),17-38,2017.
- KOLENBRANDER, P.E.; PALMER JR, R.J.; RICKARD, A.H.; JAKUBOVICS, N.S.; CHALMERS, N.I.; DIAZ, P.I. **Bacterial interactions and successions during plaque development.** *Periodontol.* 2000.,42,47–79,2006.
- KOLEMBRANDER, P.E. **Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source.** *Int J Oral Sci.*,3(2),49-54,2011.
- KOMIYAMA, E.Y.; LEPESQUEUR, L.S.S.; YASSUDA, C.G.; SAMARANAYAKE, L.P.; PARAHITIYAWA, N.B.; BALDUCCI I, et al. **Enterococcus Species in the Oral Cavity: Prevalence, Virulence Factors and Antimicrobial Susceptibility.** *PLoS ONE.*,11(9), e0163001,2016.
- KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.**5. ed. Rio de Janeiro: *Medsa*, 2001.
- KUMAR, P. S.; A. L. GRIFFEN, J. A.; BARTON, B. J.; PASTER, M. L.; MOESCHBERGER;LEYS, E.J. **New bacterial species associated with chronic periodontitis.** *J. Dent. Res.*,82,338–344,2003.

- KUMAR, P.S.; GRIFFEN, A.L.; MOESCHBERGER, M.L.; LEYS, E.J. **Identification of Candidate Periodontal Pathogens and Beneficial Species by Quantitative 16S Clonal Analysis.** Journal of Clinical Microbiology.,43(8),3944–3955,2005.
- JOHNSON EM, FLANNAGAN SE, SEDGLEY CM. **Coaggregation interactions between oral and endodontic Enterococcus faecalis and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis.** J Endod.,32(10),946-50,2006.
- LAINE, M.L.; CRIELAARD, W.; LOOS, B.G. **Genetic susceptibility to periodontitis.** Periodontol 2000.,58(1),37-68,2012.
- LAM, O.L.; MCGRATH, C.; LI, L.S.; SAMARANAYAKE, L.P. **Effectiveness of oral hygiene interventions against oral and oropharyngeal reservoirs of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative bacilli.** Am J Infect Control.,40(2),175-182, 2012.
- LAMONT, R.J.; HAJISHENGALLIS, G. **Polymicrobial synergy and dysbiosis in inflammatory disease.** Trends Mol Med.,21(3),172-83,2015.
- LA ROSA, S.L.; MONTEALEGRE, M.C.; SINGH, K.V.; MURRAY, B.E. **Enterococcus faecalis Ebp pili are important for cell-cell aggregation and intraspecies gene transfer.** Microbiology.,162(5),798-802,2016.
- LEÃO-VASCONCELOS, L.S.N.O.; LIMA, A.B.M., et al. **Enterobacteriaceae isolates from the oral cavity of workers in a Brazilian oncology hospital.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo.,57(2),121-127,2015.
- LINDENSTRAU, A.G.; PAVLOVIC, M.; BRINGMANN, A.; BEHR, J.; EHRMANN, M.A.; VOGEL, R.F. **Comparison of genotypic and phenotypic cluster analyses of virulence determinants and possible role of CRISPR elements towards their incidence in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium.**Syst Appl Microbiol.,34,553-560,2011.
- LIVRELLI, V.; De CHAMPS, C.; Di MARTINO, P.; DARFEVILLE-MICHAUD, A.;FORESTIER, C et al. **Adhesive properties and antibiotic resistance of Klebsiella.**Microbiol.,34,1963–1969,1996.
- LOE, H.; THEILADE, E.; JENSEN, S.B. **Experimental gingivitis in man.** Journal of Periodontology.,36,177–87,1965.
- LOURENCO, T.G.B.; HELLER, D.; SILVA-BOGHOSSIAN, C.M.; COTTON, S.L.; PASTER, B.J.; COLOMBO, A.P.V. **Microbial signature profiles of periodontally healthy and diseased patients.** J Clin Periodontol.,41(11),1027-1036,2014.
- McCRARY, B.R.; STRECKFUSS, J.L.; KEENE, H.J. **Oral hygiene and the Prevalence of oral group D streptococci in medical-physically compromised and Periodontal diseases patients.** J Periodontol.,60,255-258,1989.
- MAGER, D.L.; XIMENEZ-FYVIE, L.A.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S. **Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces.** J Clin Periodontol.,30,644-654,2003.
- MAGIORAKOS, A.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKES, C.G.; MONNET, D.L. **Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.**Clin. Microbiol.,18,268-281,2012.

- MANERO, A.; BLANCH, A.R. **Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key.** Applied and Environmental Microbiology.,65(10),4425-4430,1999.
- MEYLE J, CHAPPLE I. **Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis.** Periodontol 2000.,69(1),7-17,2015.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Projeto SBBrazil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – Resultados Principais.**2011.
- MURRAY, B.L. **The life and times of the enterococcus.** Clin Microbial Rev.,(3),46-65, 1990.
- NAJAFI, K.; GANBAROV, K.; GHOLIZADEH, P.; et al. **Oral cavity infection by *Enterococcus faecalis*: virulence factors and pathogenesis.** Reviews in Medical Microbiology.,31(2),51-60,2020.
- NAKAYAMA, J.;KARIYAMA, R.;KUMON, H. **Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding *fsr* genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of *Enterococcus faecalis* in urine.**Applied and Environ Microbiol.,68,3152-3155,2002.
- NEWMAN, M.G.;KORNMAN, K.S.; Doher, T.Y.**A 6-month multi-center evaluation of adjunctive tetracycline fiber therapy used in conjunction with scaling and root planning in maintenance patients: clinical results.**J Periodontol.,65,685-691, 1994.
- NOUÉR, S. A. **Aspectos clínicos e fatores de risco relacionados com colonização ou infecção por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente.** Tese (Doutorado em Medicina) – Programa de Pós Graduação em Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 144f, 2007.
- OBEROI SS, DHINGRA C, SHARMA G, SARDANA D. **Antibiotics in dental practice: how justified are we.** Int Dent J.,65,4-10,2015.
- O'NEILL, J. **Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations.** The Review on Antimicrobial Resistance.,1-16,2014.
- OPPERMANN, R. V., HAAS, A. N., RÖSING, C. K., AND SUSIN, C. **Epidemiology of periodontal diseases in adults from Latin America.** Periodontol 2000,67,13–33,2015.
- PAGE, R. C.; OFFENBACHER, S.; SCHROEDER, H. E.; SEYMOUR, G. J.; KORNMAN, K. S. **Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions.** Periodontology 2000.,14,216-48,1997.
- PAPAPANOU, P.N.; SANZ, M.; BUDUNELI, N.; DIETRICH, T.; FERES, M.; FINE, D.H.; et al. **Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions.** J Periodontol.,89(1),S173-S182, 2018.
- PASTER, B. J., BOCHES, S. K., GALVIN, J. L., et al. **Bacterial diversity in human subgingival plaque.** J Bacteriol.,183,3770–3783,2001.
- PASTER, B. J., OLSEN, I., AAS, J. A., DEWHIRST, F. **The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites.** Periodontol 2000.,42,80–87, 2006.
- PASTER, B.J.; DEWHIRST, F.E. **Molecular microbial diagnosis.** Periodontol 2000.,51, 38–44,2009.

- PASTERAN, F.; MENDEZ, T.; GUERRIERO, L.; RAPOPORT, M.; CORSO, A. **Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae.** J Clin Microbiol.,47(6),1631-1639,2009.
- PEIRANO, G. et al. **First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil.**Antimicrobial Agents and Chemotherapy Dec.,53(1),333-334,2009.
- PETERSEN, P.E.; OGAWA, H. **Strengthening the prevention of periodontal disease: the WHO approach.** J Periodontol.,76(12),2187-2193,2005.
- PRESTINACI, F.; PEZZOTTI, P.; PANTOSTI, A. **Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon.** Pathog Glob Health.,109(7),309-318,2015.
- PIENIZ, S.; ANDREAZZA, R.; ANGHINONI,T.; CAMARGO, F.; BRANDELLI, A. **Probiotic potential, antimicrobial and antioxidant activities of *Enterococcus durans* strain LAB18s.**Food Control.,37(0),251-256,2014.
- PLÉSIAT, P., NIKAIDO, H. **Outer membranes of gram-negative bacteria are 25.** Poole K, Gotoh N, Tsujimoto H, et al. **Overexpression of the mexC permeable to steroid probes.** Mol Microbiol.,6,1323–33,2002.
- POETA, P.; COSTA,D.; RODRIGUES,J.; TORRES, C.**Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal.** Int. J. Antimicrob. Agents.,27,131-137,2006.
- POLLACK, M. **P. aeruginosa.** In: *Mandell Dab*, editor. Principles and Practice of Infectious Diseases.5.New York: Chuchill Linvingstone;2000.
- RAMS, T.E.; FEIK, D.; SLOTS, J. **Staphylococci in human periodontal diseases.** Oral Microbiol Immunol.,5,29–32,1990.
- RAMS, T. E.; FEIK, D.; YOUNG, V.; HAMMOND, B.F.; SLOTS, J. **Enterococci in human periodontitis.** Oral Microbiol. Immunol.,7,249,1992.
- RAMS, T.E.; FLYNN, M.J.; SLOTS, J. **Subgingival microbial associations in severe human periodontitis.** Clin Infect Dis.,25(2),224–226,1997.
- RAMS, T.E.; FEIK, D.; MORTENSEN, J.E.; DEGENER, J.E.; VAN WINKELHOFF, A.J. **Antibiotic susceptibility of periodontal *Enterococcus faecalis*.** J Periodontol.,84, 1026–33,2013.
- RANGANATHAN, A.T.; SARATHY, S.; CHANDRAN, C.R.; IYAN, K. **Subgingival prevalence rate of enteric rods in subjects with periodontal health and disease.** J Indian Soc Periodontol.,21(3),224-8,2017.
- RAZAVIA.; GMU R, R.; IMFELD, T.; ZEHNDER, M. **Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healthy subjects.** Oral Microbiology and Immunology.,22,248–51,2007.
- ROÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F. Jr.; SANTOS, K.R.N. **Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases.** J Endod.,30,315-320,2004.
- SANTOS, S.S.F. **Presença de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* na cavidade bucal humana.** Thesis. São Paulo: University of Taubaté, 1–72,1996.
- SCANNAPECIO, F.A.; BUSH, R.B.; PAJU, S. **Associations between periodontal disease and risk for nosocomial bacterial pneumonia and chronic obstructive pulmonary disease. A systematic review.** Ann Periodontol.,8(1),54-69,2003.
- SALAH, R.; DAR-ODEH, N.; ABU HAMMAD, O.; SHEHABI, A.A. **Prevalence of putative virulence factors and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus***

- faecalis isolates from patients with dental Diseases.** BMC Oral Health.,1(8),17, 2008.
- SEDGLEY, C.M.; SAMARANAYAKE, L.P. **The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in Hong Kong Chinese.** Arch Oral Biol.,39,459–466,1994.
- SEDGLEY, C.M.; SAMARANAYAKE, LP. **Oral and oropharyngeal prevalence of *Enterobacteriaceae* in humans: A review.** J Oral Pathol Med.,23,104-13,1994.
- SEDGLEY, C.M.; CHU, C.S.; LO, E.C.M.; SAMARANAYAKE, L.P. **The oral prevalence of aerobic and facultatively anaerobic gram-negative rods and yeasts in semi semirecluse human vegetarians.** Arch Oral Biol.,41,307–309,1996.
- SEDGLEY, C.M.; SAMARANAYAKE, L.P.; CHAN, J.C.Y.; WEY, S.H.Y. **A 4-yearlongitudinal study of the oral prevalence of enteric gram-negative rods and yeasts in Chinese children.** Oral Microbiol Immunol.,12,183–188,1997.
- SEDGLEY, C.M.; LENNAN, S.L.; CLEWELL, D.B. **Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci.** Oral Microbiol Immunol.,19(2),95-101,2004.
- SEDGLEY CM, NAGEL AC, SHELBURNE CE, CLEWELL DB, APPELBE O, MOLANDER A. **Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans.** Arch Oral Biol.,50(6),575-83,2005.
- SEDGLEY, C.M.; LEE, E.H.; MARTIN, M.J.; FLANNAGAN, S.E. **Antibiotic resistance gene transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals of teeth ex vivo.** Journal of Endodontics.,34(5),570-574,2008.
- SEMEDO, T.; SANTOS, M.A.; LOPES, M.F.S.; FIGUEIREDO, J.J.; CRESPO, T.B.; TENREIRO, R. **Virulence Factors in Food, Clinical and Reference Enterococci: A Common Trait in the Genus?.** Systematic and Applied Microbiology.,26(1),13-22, 2003.
- SEMEDO-LEMSADDEK, T.; BARRETO-CRESPO, M.T.; TENREIRO,R.**Occurrence of Putative Pathogenicity Islands in Enterococci from Distinct Species and of Differing Origins.**Applied and Environmental Microbiology.,75(22),7271-7274, 2009.
- SEMEDO-LEMSADDEK T, MATO R. **Pathogenesis and Virulence.**In: *Semedo-Lemsaddek T., BarretoCrespo M. T., Tenreiro R.* (Ed.) *Enterococcus and Safety*, Nova Science Publisher, New York, In Press., 2011.
- SHANKAR, V.; BAGHDAYAN, A.S.; HUYCKE, M.M.; LINDAHL, G.; GILMORE, M.S. **Infection-Derived *Enterococcus faecalis* Strains Are Enriched in *esp*, a Gene Encoding a Novel Surface Protein.** Infection and Immunity.,67(1),193-200,1999.
- SHEIHAM, A.; NETUVELI, G.S. **Periodontal diseases in Europe.** J Periodontol.,29,104-21,2002.
- SILVA-BOGHOSSIAN, C. M.; AMARAL, C.; MAIA, L. C.; LUIZ, R. R. ; COLOMBO, A. P. V.. **Manual and electronic probing of the periodontal attachment level in untreated periodontitis: A systematic review.** Journal of Dentistry.,36,651-657, 2008.
- SILVA- BOGHOSSIAN, C.M.; SOUTO, R.M.; LUIZ, R.R.; COLOMBO, A.P. **Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases.** Arch Oral Biol.,56(9),899-906,2011.

- SILVA- BOGHOSSIAN, C.M.; ORRICO, S.R.; GONÇALVES, D.; CORREIA, F.O.; COLOMBO, A.P. **Microbiological changes after periodontal therapy in diabetic patients with inadequate metabolic control.** Braz Oral Res.,28(1),2014.
- SILVA-SENE, M.X.; HELLER, D.; VARELA, V.M.; TORRES,M.C.; FERES-FILHO, E.J.; COLOMBO, A.P. **Clinical and microbiological effects of systemic antimicrobials combined to an anti-infective mechanical debridement for the management of aggressive periodontitis: a 12-month randomized controlled trial.** J Clin Periodontol.,40(3),242-251,2013.
- SINGH KV, NALLAPAREDDY SR, SILLANPÄÄ J, MURRAY BE. **Importance of The collagen adhesin ace in pathogenesis and protection against Enterococcusfaecalis experimental endocarditis.** PLoS Pathog.;6(1),e1000716, 2010.
- SIQUEIRA, J. F. Jr.; ROÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. **Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections.**J. Endod.,28,168,2002.
- SLOTS, J. **Subgingival microflora and periodontal disease.** Journal of Clinical Periodontology.,6,351–382,1979.
- SLOTS J., RAMS T.E., LITSGARTEN, M.A. **Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis.** Oral Microb Immunol.,3,47-52, 1988.
- SLOTS, J.; FEIK, D.; RAMS, T.E. **Age and sex relationships of superinfecting microorganisms in periodontitis patients.** Oral Microbiol Immunol.,5,305–308, 1990.
- SLOTS J., RAMS, T.E. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* and *Acinetobacter* in human periodontitis.** Oral Microbiol Immunol.,5,149-154,1990.
- SLOTS J., RAMS T.E., FEIK D., TAVERAS H.D., GILLESPIE, G.M..**Subgingival microflora of advanced periodontitis in the Dominican Republic.**Oral Microbiol Immunol.,62,543-547,1991.
- SMITH, G.L.; SOCRANSKY, S.S.; SMITH, C.M. **Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms.** Oral Microbiol Immunol.,4,47-51,1989.
- SMITH, A. J.; JACKSON, M.S.; BAGG, J. **The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity.**J. Med. Microbiol.,50,940,2001.
- SOCRANSKY, S. S.; SMITH, C.;MARTIN, L.;PASTER, B. J.; DEWHIRST, F.E.;LEVIN, T.E."**Checkerboard" DNA-DNA hybridization.**Biotech.,17,788, 1994.
- SOCRANSKY, S.S. **Microbiology of periodontal disease – present status and future considerations.** Journal of Periodontology.,48,497–504,1977.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D.; CUGINI, M. A.; SMITH, C.; KENT JR, R. L.**Microbial complexes in subgingival plaque.** J Clin Periodontol.,25,134-144,1988.
- SOCRANSKY, S.S.;HAFFAJEE, A.D. **The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts.** J Periodontol.,63,322-31,1992.
- SOCRANSKY, S. S.; HAFFAJEE, A. D. **Dental biofilms: difficult therapeutic targets.**Periodontol 2000.,28,12-55,2002.

- SONG, X.; SUN, J.; MIKALSEN, T.; ROBERTS, A.P.; SUNDSFJORD, A. **Characterisation of the Plasmidome within *Enterococcus faecalis* Isolated from Marginal Periodontitis Patients in Norway.** PLoS ONE.,8(4),e62248,2013.
- SOUTO, R.; COLOMBO, A.P. **Prevalence of *Enterococcus faecalis* in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection.** Arch Oral Bio., 53(2),155-160,2008a.
- SOUTO, R.; COLOMBO, A.P. **Detection of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction in the subgingival biofilm and saliva of non-dyspeptic periodontal patients.** J Periodontol.,79(1),97-103,2008b.
- SOUTO, R.; SILVA, C. M. ; COLOMBO, A.P.V. **Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. in subgingival biofilm and saliva of subjects with chronic periodontal infection.** Brazilian Journal of Microbiology.,45,495-501,2014.
- SPANU, T., et al. **Italian ESBL Study Group. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs.** Antimicrob Agents Chemother.,46 (1),196-202,2002.
- SUBRAMANIAN, K.; MICKEL, A.K. **Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile.** J Endod.,35(7),950-7, 2009.
- SUN, J.; SONG, X.; KRISTIANSEN, B.E.; KJAERENG, A.; WILLEMS, R.J.; ERIKSEN, H.M.; SUNDSFJORD, A.; SOLLID, J.E. **Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of enterococci in marginal and apical periodontitis.** J Clin Microbiol.,47,2218–2225,2009.
- SUN, J.; SUNDSFJORD, A.; SONG, X. ***Enterococcus faecalis* from patients with chronic periodontitis: virulence and antimicrobial resistance traits and determinants.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis.,31,267–272,2012.
- SULLIVAN, A.; EDLUND, C.; NORD, C.E. **Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora.** The Lancet Infectious Diseases.,1,101–14,2001.
- TAKEUCHI, D.; AKEDA, Y.; SUGAWARA, Y. et al. **Establishment of a dual-wavelength spectrophotometric method for analysing and detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.** Sci Rep.,24;8(1),15689,2018.
- TELES R.; TELES F.; FRIAS-LOPEZ J.; PASTER B.; HAFFAJEE, A. **Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology.** Periodontol 2000.,62(1),95-162,2013.
- TENOVER, F.C. **Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.** Am. J. Med.,119,S 3-10,2006.
- THURNHEER, T.; BELIBASAKIS, G.N. **Integration of non-oral bacteria into in vitro oral biofilms.** Virulence.,6(3),258-64,2015.
- TONETTI, M. S. & MOMBELLI, A. **Early-onset periodontitis.** Annals of Periodontol.,4, 39-53,1999.
- TSIKRIKONIS, G.; MANIATIS, A. N.; LABROU, M.; NTOKOU, E.; MICHAIL, G.; DAPONTE, A.; STATHOPOULOS, C.; TSAKRIS, S. P. **Differences in biofilm formation and virulence factors between clinical and fecal enterococcal isolates of human and animal origin.** Microbial Pathogenesis.,52,336-343,2012.



- VAN BOECKEL TP, GANDRA S, ASHOK A, CAUDRON Q, GRENFELL BT, LEVIN SA, LAXMINARAYAN, R. **Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data.** *Lancet Infect Dis.*,14(8),742–750, 2014.
- VAN HOEK, A.H.A.M.; MEVIUS, D.; GUERRA, B.; MULLANY, P.; ROBERTS, A.P.; AARTS, H.J.M. **Acquired antibiotic resistance genes: an overview.** *Front Microbiol.*,2, 1-27,2011.
- VIGNAROLI, C., ZANDRI, G., AQUILANTI, L. et al. **Multidrug Resistant Enterococci in Animal Meat and Faeces and Co-Transfer of Resistance from an *Enterococcus durans* to a Human *Enterococcus faecium*.** *Curr Microbiol.*,62, 14-38,2011.
- VOLLAARD, E.J.; CLASENER, H.A. **Colonization resistance.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*,38,409–14,1994.
- WADE, W.G. **The oral microbiome in health and disease.** *Pharmacological Research.*, 69,137– 143,2013.
- WALSH, C. **Where will new antibiotics come from?** *Nat Rev Microbiol.*,1,65-70,2003.
- WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. **Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm.** *Clinical Microbiology Reviews.*,18,306-325,2005.
- WALKER, C.B. **The acquisition of antimicrobial resistance in the periodontal microflora.** *Periodontol 2000.*,10,79-88,1996.
- WANG, L.; DONG, M.; ZHENG, J.; et al. **Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment.** *J Endod.*,37(5),631-6,2011.
- WHO. **Global action plan on antimicrobial resistance.** World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/>. Acesso em: 20/08/2019.
- WILSON ARUNI, A.; MISHRA, A.; DOU, Y.; CHIOMA, O.; BRITTANY, N. H.; FLETCHER, H.M. ***Filifactor alocis* – a new emerging periodontal pathogen.** *Microbes and Infection.*,17(7),517-530,2015.
- WOLFF, L.; DAHLE`N, G. .; AEPPLI, D. **Bacteria as risk markers for periodontitis.** *Journal of Periodontology.*,65, 498–510,1994.
- ZAURA, E.; KEIJSER, B.J.; HUSE, S.M.; CRIELAARD, W. **Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities.** *BMC Microbiol.*, 9,259,2009.
- ZOLETTI, G.O.; SIQUEIRA, J.F. JR.; SANTOS, K.R. **Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches.** *J Endod.*,32(8),722-6,2006.
- ZOLETTI, G.O.; PEREIRA, E.M.; SCHUENCK, R.P.; TEIXEIRA, L.M.; SIQUEIRA, J.F. JR.; DOS SANTOS, K.R. **Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals.** *Res Microbiol.*,162(2),151-8,2011.

## ANEXO I

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
CLEMENTINO FRAGA FILHO  
(HUCFF/ UFRJ)



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Pesquisa da boca como um reservatório de germes que fazem mal à saúde

**Pesquisador:** Renata Martins do Couto

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 31911214.0.0000.5257

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - INSTITUTO DE

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 707.510

**Data da Relatório:** 25/05/2014

**Apresentação do Projeto:**

Protocolo 127-14 do grupo III, recebido em 3.6.2014.

Foram apresentados os seguintes documentos:

1. Carta de apresentação anexada em 3.6.14;
2. Declaração da Instituição Coparticipante da Faculdade de Odontologia anexada em 28.5.14;
3. TCLE para sujeitos captados no CTI do HUCFF/UFRJ anexado em 28.5.14;
5. TCLE para sujeitos captados na Clínica da Fac.Odontologia/UFRJ anexado em 28.5.14;
7. Relação dos links dos currículos lattes anexada em 28.5.14;
8. Currículo vitae da pesquisadora: Ana Lúcia Pereira Matera Machado anexado em 28.5.14;
9. Cronograma do estudo anexado em 28.5.14;
10. Projeto Detalhado anexado em 3.6.14;
11. Declaração da Instituição Co-participante do HUCFF anexada em 28.5.14

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Determinar a prevalência de microrganismos patogênicos de importância médica, seus fatores de virulência e perfil de susceptibilidade aos

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.941-913  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3508-2480 Fax: (21)3508-2481 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
CLEMENTINO FRAGA FILHO  
((HUCFF/ UFRJ))



Continuação do Parecer: 707.510

200

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

1. A Folha de Rosto está adequadamente preenchida e com as assinaturas necessárias;
2. A Carta de Apresentação devidamente assinada pelos membros da equipe;
3. Os currículos dos pesquisadores os qualificam para a pesquisa;
4. Carta de Instituição co-participante devidamente apresentada e assinada para a Faculdade de Odontologia da UFRJ;
4. Carta de Instituição co-participante devidamente apresentada e assinada para o HUCFF/UF RJ;
5. Projeto de Pesquisa apresentado em formato doc (.word) contém todos os itens necessários;
6. Os TCLEs são específicos para paciente ambulatoriais ou para pacientes hospitalizados, constando em ambos os termos:
  - a- os objetivos e procedimentos que serão realizados;
  - b- explicitação dos possíveis riscos e benefícios decorrentes da participação na pesquisa;
  - c- garantia de plena liberdade ao participante da pesquisa de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase, sem penalização alguma;
  - d- garantia de manutenção do sigilo e da privacidade dos participantes da pesquisa;
  - e- ser legítimo o direito do paciente a indenização em caso de eventual dano;
  - f- garantia de que o participante receberá uma via do TCLE;
  - g- explica da elaboração em duas vias rubricadas e assinadas pelo participante e pesquisador

**Recomendações:**

Nenhuma.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Nenhuma.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Aprovação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

1. De acordo com o item X.1.3.b, da Resolução CNS n.º 466/12, o pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais que permitam ao CEP acompanhar o desenvolvimento dos projetos.
2. Eventuais emendas (modificações) ao protocolo devem ser apresentadas, com justificativa, ao CEP, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada.

Endereço: Rua Prof. Rodolpho Paulo Rocco Nº255 Sala 01D-46  
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 21.541-913  
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO  
 Telefone: (21)3038-2490 Fax: (21)3038-2491 E-mail: cep@hucff.ufrj.br

## ANEXO II

### PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORAMENTO

Espíndola LCP, Colombo APV. Lack of adjunctive effect of 0.1% sodium hypochlorite mouthwash combined to full-mouth ultrasonic debridement on supragingival plaque, gingival inflammation, and subgingival microbiota: A randomized placebo-controlled 6-month trial. *Clin Exp Dent Res*. 2017 Mar 31;3(2):51-61. doi: 10.1002/cre2.60. PMID: 29744179; PMCID: PMC5719817.

Silva NLC, Motta NAV, Soares MA, Araujo OMO, Espíndola LCP, Colombo APV, Lopes RT, Brito FCF, Miranda ALP, Tributino JLM. Periodontal status, vascular reactivity, and platelet aggregation changes in rats submitted to hypercholesterolemic diet and periodontitis. *J Periodontal Res*. 2020 Jun;55(3):453-463. doi: 10.1111/jre.12730. Epub 2020 Jan 28. PMID: 31994219.

Espíndola LCP, Boghossian CMS, Colombo AP. Diagnóstico das Doenças Periodontais.. In: Sergio Kahn; Ricardo Guimarães Fischer; Alexandra Tavares Dias. (Org.). (Org.). *Testes Diagnósticos - Teste de Diagnóstico Microbiológico..* 1ed.São Paulo: Quintessence editora Brasil, 2019, v. 1, p. 129-141.

Prevalence of Enterococcus Species in Adults with Periodontal Health and Periodontitis: A Systematic Review. Espíndola LCP, Oliveira AM, Masterson D, Maia LC. Manuscript ID BOR-2020-1106. Date Submitted 03-Out-2020.

## ANEXO III

## COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

**Journal of Periodontology - Account Created in ScholarOne Manuscripts**

Office JPER Editorial &lt;onbehalf@manuscriptcentral.com&gt;

Qui, 12/11/2020 20:35

Para:

- laisespindola@hotmail.com <laisespindola@hotmail.com>  
12-Nov-2020

Dear Dr. Espíndola:

A manuscript titled "Antimicrobial susceptibility and virulence of Enterococcus spp. isolated from periodontitis-associated subgingival biofilm." (JOP-20-0815) has been submitted by Dr. Ana Paula Colombo to the Journal of Periodontology.

You are listed as a co-author for this manuscript. The online peer review system, ScholarOne Manuscripts

(<https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fjperio&data=04%7C01%7C%7C4ac9f76894e0444fa6ab08d8874a7658%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637408101159801301%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzIiLCJBTiI6IjEhaWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&data=34PU9aXF6vz2PxRf2W189z2evfCv13jutiExF1V18vI%3D&reserved=0>), automatically creates a user account for you. Your USER ID is laisespindola@hotmail.com. Please click the link below to set your password:

[https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fjperio%3FURL\\_MASK%3Db8fb6d64d63a497f94a54a366457f362&data=04%7C01%7C%7C4ac9f76894e0444fa6ab08d8874a7658%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637408101159806310%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzIiLCJBTiI6IjEhaWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&data=3oUgnIIF%2Bz9L%2FWLiZHMZACIOA1ZrR%2FDvsf2FjFHHHe0%3D&reserved=0](https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fjperio%3FURL_MASK%3Db8fb6d64d63a497f94a54a366457f362&data=04%7C01%7C%7C4ac9f76894e0444fa6ab08d8874a7658%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637408101159806310%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzIiLCJBTiI6IjEhaWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&data=3oUgnIIF%2Bz9L%2FWLiZHMZACIOA1ZrR%2FDvsf2FjFHHHe0%3D&reserved=0)

Once you have set your password, you may log in to the site by going to <https://nam01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fjperio&data=04%7C01%7C%7C4ac9f76894e0444fa6ab08d8874a7658%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637408101159806310%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzIiLCJBTiI6IjEhaWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&data=DoUpSfP%2FUrRxpIm42T0nmdmSpBFDTsxiVVq3%2BfQIIN8%3D&reserved=0> and entering your USER ID and the PASSWORD you created. Once you have logged in, you can check the status of papers you have authored/co-authored in your Author Center.

Sincerely,

Michelle Martire  
Editorial Coordinator  
Journal of Periodontology  
E-mail: jper@wiley.com

## ANEXO IV

## PROJETO DE PESQUISA EM PERIODONTIA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

## FICHA DE ANAMNESE

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

Data de Nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Estado civil: \_\_\_\_\_ Profissão: \_\_\_\_\_

Número do prontuário: \_\_\_\_\_ Número na pesquisa: \_\_\_\_\_

Nome de contato: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

Sua renda familiar é: ( ) 1. Menor de R\$380,00 ( ) 2. de R\$381,00 a \$600,00 ( ) 3. de R\$601,00 a \$1000,00 ( ) 4. de R\$1001,00 a R\$1500,00 ( ) 5. mais de R\$1500,00

Raça: ( ) Negro ( ) Pardo ( ) Branco ( ) Outros

Quantas pessoas na família: ( )

Nível de escolaridade: Sabe ler e escrever? ( ) Sim ( ) Não

Qual é o curso mais elevado que cursou, no qual concluiu pelo menos uma série? \_\_\_\_\_

## Questionário Médico

1. Nome do seu médico: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_

2. Data do último exame médico: \_\_\_\_\_

3. Você já foi hospitalizado(a)? \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

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

5. Você está sob cuidados médicos? \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

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

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

a) Doenças congênitas do coração? \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

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

• Respiração difícil quando deitado ou sem fazer esforço? \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

• Inchaço nos pés ou nos tornozelos? \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

• Dor, pressão ou mal estar no peito? \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

c) Febre reumática? \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

d) Endocardite bacteriana? \_\_\_\_\_ ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

- e) Sopros no coração? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- f) Desmaios convulsões ou epilepsia? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- g) Dor de cabeça freqüente (2 ou mais por semana)? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- h) Tratamento nervoso? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- i) Problemas pulmonares (ex.: tuberculose, asma, enfisema, bronquite)? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- j) Hepatite, doenças hepáticas, icterícia? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- k) Artrite ou dores articulares? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- l) Doenças sexualmente transmissíveis (ex.: sífilis, gonorréia, AIDS)? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- m) Diabetes?
- Demora na cicatrização dos ferimentos? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
  - Você urina mais de seis vezes por dia? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
  - Você sente sede a maior parte do tempo? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- n) Problemas sangüíneos (ex.: anemia, fragilidade capilar, coagulação, sangramento, hemoptise, melena, hematemesa, hemotúria, epistaxes)? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- o) Úlceras ou outros problemas estomacais? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- p) Reação alérgica a: anestésicos, antibióticos (ex.: penicilina, tetraciclina), sulfa, analgésicos, anti-inflamatórios, tranqüilizantes, outros (ex.: alimentos, iodo, poeira)? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
8. Você já sofreu transfusão sangüínea? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
9. Você está tomando algum medicamento (listar nas observações)? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
10. Você teve um aumento ou diminuição acentuada do peso? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
11. Você teve uma variação recente no apetite? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
12. Você sofreu tratamento com raios x, rádio ou cobalto? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- Somente para mulheres
13. Você já passou pela menopausa? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
14. Você está tomando algum hormônio? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

### *Questionário Odontológico*

1. Nome do seu dentista: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_
2. Freqüência de visitas ao dentista: \_\_\_\_\_
3. Data da última visita ao dentista: \_\_\_\_\_
4. História das extrações:
- a) Causa provável das extrações: \_\_\_\_\_
- b) Data da última extração: \_\_\_\_\_
- c) Você teve reações adversas durante ou após alguma extração dentária? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- d) Você teve sangramento excessivo após alguma extração dentária? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
5. Suas gengivas sangram? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
6. Você já teve algum abscesso periodontal ou GUN? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
7. Você já fez algum tratamento periodontal? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
8. Em caso de resposta positiva, qual e há quanto tempo? \_\_\_\_\_
9. Realizou profilaxia profissional nos últimos 6 meses? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
10. No momento encontra-se em tratamento ortodôntico? ( ) Sim ( ) Não ( )
- a) Alguém em sua família tem ou teve doença periodontal? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- b) Alguém em sua família teve perda precoce dos dentes? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
- c) Em caso de resposta positiva, listar quem e possíveis causas: \_\_\_\_\_
-

16. Fez uso de antimicrobianos locais (incluindo uso de enxaguatórios bucais) ou sistêmica nos últimos 6 meses? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
17. Fez uso de anti-inflamatórios nos últimos 3 meses? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
18. Quantas vezes você escova os dentes por dia?
- 
19. Alguém já lhe ensinou a escovar os dentes? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
20. Você usa fio dental? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
21. Fumante ou ex-fumante (até 10 anos) ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei
22. Você está usando ou já usou algum medicamento para tratar de problemas dentários? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

23. Em caso de resposta positiva, que medicamento, quando usou e condição que levou ao uso:

---

---

\_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Assinatura



