

Lara Catarina Gonçalves

Prevalência de genes de resistência a antibióticos em infecções periodontais:  $\beta$ -lactâmicos

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2020



Lara Catarina Gonçalves

Prevalência de genes de resistência a antibióticos em infecções periodontais:  $\beta$ -lactâmicos

Faculdade de Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2020

Lara Catarina Gonçalves

Prevalência de genes de resistência a antibióticos em infecções periodontais:  $\beta$ -lactâmicos

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa,  
como parte dos requisitos para obtenção do  
grau de Mestre em Medicina Dentária.

---

Lara Catarina Gonçalves

## RESUMO

Entre os agentes patogénicos normalmente presentes na periodontite em adultos estão as espécies *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*, sendo estas das mais frequentes.

O tratamento da periodontite envolve o uso de antibioterapia usualmente utilizada como método de controlo da periodontite em adultos, sendo esta muitas vezes usada empiricamente. Normalmente não são feitos exames laboratoriais de modo a perceber qual a antibioterapia mais indicada para cada paciente, sendo por isso habitual a escolha de um antibiótico de largo espectro, sendo o grupo dos  $\beta$ -lactâmicos a primeira opção. Esta estratégia tem levado ao aparecimento de cada vez mais resistências bacterianas.

Para a escolha adequada da correta antibioterapia é fundamental a identificação das estirpes envolvidas no desenvolvimento desta patologia e dos seus genes de resistência. Deste modo, este estudo teve por objetivo a identificação de genes de resistência a antibióticos em estirpes bacterianas previamente isoladas e identificadas, de infeções periodontais de adultos portugueses. Foi realizada a identificação dos genes de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, *TEM* e *cfxA* por PCR.

Os resultados mostraram que 32% do total de isolados apresentava um dos genes analisados. Destes, 2% correspondiam à presença do gene *cfxA*, tendo sido identificados como *P. intermedia*. Os restantes 30% eram estirpes que continham o gene *TEM*. A maioria das estirpes que continham o gene *TEM* foram identificadas como *P. intermedia* (20%) enquanto 8% pertencia a espécies de pigmentação negra não identificadas e 2% eram *P. gingivalis*.

**Palavras-chave:** *Porphyromonas sp*; *Prevotella sp*; genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos; Periodontite

## ABSTRACT

Among the pathogenic agents usually present in periodontitis in adults are the species *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia*, that are the most frequently found.

The treatment of periodontitis involves the use of antibiotherapy usually used as a control method for periodontitis in adults, being frequently use empirically. Laboratory tests to identify the most adequate antibiotherapy to use in each patient are not performed usually, so the most usual choice is the use of a broad-spectrum antibiotic, knowing that the group of  $\beta$ - lactâmics is the first option. This strategy is leading to the appearance of more and more bacterial resistances to antibiotics.

For the correct choice of the adequate antibiotherapy it is crucial the identification of the strains involved in the development of this pathology and their antibiotic resistance genes. In this way, this study had as goal the identification of antibiotic resistance genes in bacterial strains previously isolated and identified, from periodontal infections of Portuguese adults. The identification of the genes *TEM* and *cfxA*, conferring resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics was performed by PCR.

Results showed that 32% of isolates harboured one of the tested genes. From these, 2% corresponded to the presence of the *cfxA* gene, being identified as *P. intermedia*. The remaining 30% were strains having the *TEM* gene. Most strains with the TEM gene were identified as *P. intermedia* (20%) while 8% belonging to black-pigmented strains not previously identified and 2% were *P. gingivalis*.

**Keywords:** *Porphyromonas sp*; *Prevotella sp*;  $\beta$ -lactamic resistance genes; Periodontitis

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, pelo esforço que sempre fizeram por mim e para que eu pudesse ser mais e melhor. Sem eles nada disto seria possível. Sou lhes eternamente grata.

A todos os meus familiares que sempre acreditaram em mim e sempre desejaram o meu sucesso.

Aos meus amigos mais próximos que sempre me apoiaram e estiveram lá tantos nos bons como nos maus momentos, sem hesitar. Sei que ficarão para a vida.

À minha binóxima e melhor amiga, Inês Maia, pelo trabalho em equipa, pelas batalhas que vencemos juntas e pela amizade incondicional.

Ao André, pela paciência, pelos dias de estudo árduo que pareciam não ter fim, por todo o amor e carinho, por me fazer sorrir mesmo nos meus piores dias, por não deixar de acreditar no meu potencial e por nunca me deixar perder a motivação.

A mim, por me recusar a desistir por maiores que sejam as adversidades e por me tornar cada vez mais forte à medida que estas surjam.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a oportunidade de poder ter participado nesta investigação que acrescentou muito à minha formação e à minha vida.

À minha orientadora, Cristina Pina, por todo o apoio na elaboração da tese, pelo tempo dedicado e pela procura pelo melhor rigor científico e excelência.

À minha coorientadora, Inês Cardoso, por toda a disponibilidade e agilidade em ajudar, pelos ensinamentos prestados durante a investigação e equivalente primor de orientação.

Ao meu amigo e colega neste estudo, Daniel Freitas, por todas as horas que passámos a rever matéria ao longo deste 5 anos, por todos os bons momentos e por ter tornado a investigação ainda mais animada.

A todos os docentes que contribuíram com os seus conhecimentos e profissionalismo para que eu pudesse agora refazer o meu caminho e seguir o meu sonho.



## ÍNDICE

RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VI
DEDICATÓRIA.....	VII
AGRADECIMENTOS.....	VIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS .....	XI
I. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. Microbioma humano .....	2
1.1.1. Microbioma Oral.....	3
1.2. Doença periodontal.....	3
1.2.1. Espécies bacterianas patogênicas.....	5
1.2.2. Tratamento .....	7
1.2.3. Mecanismos de resistência a $\beta$ -lactâmicos .....	10
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1. Amostragem .....	12
2.2. Análise por PCR para identificação de genes de resistência ( <i>TEM</i> e <i>cfxA</i> ) .....	13
III. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	13
IV. CONCLUSÃO .....	15
Limitações do estudo .....	15
Pesquisas futuras .....	15
V. BIBLIOGRAFIA.....	16
ANEXOS.....	21

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1. Classificação de Socransky das bactérias subgingivais (adaptado de Popova *et al.*, 2013).**

..... 6

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1. Resultados obtidos na identificação de estirpes isoladas usando API e PCR</b> (Pina <i>et al.</i> , 2011) e na identificação de genes de resistência a $\beta$ -lactâmicos. ....	14
---	----

## I. INTRODUÇÃO

As infecções provocadas por bactérias multirresistentes são um problema de saúde pública mundial, em que o uso incorreto dos antibióticos é um contribuinte significativo (Patini *et al.*, 2020).

Aproximadamente 2 milhões de infecções por bactérias resistentes a antibióticos ocorrem anualmente nos Estados Unidos, resultando em 23,000 mortes. Além disso, essas infecções causam um risco aumentado de hospitalização e complicações (Watkins e Bonomo, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que na Europa, em apenas um ano, ocorrem 25,000 mortes com grandes despesas em saúde e perda de produtividade de aproximadamente 1.5 bilhões de euros ao ano (La Fauci e Alessi, 2018).

A resistência a antibióticos é um resultado evolutivo inevitável, resultante do desenvolvimento de mutações genéticas pelos microrganismos de modo a evitar a pressão seletiva letal. Enquanto forem usados antibióticos, as bactérias continuarão a desenvolver mecanismos de resistência. Mais de 70% das bactérias patogênicas são resistentes a pelo menos um antibiótico (Watkins e Bonomo, 2016).

As doenças periodontais destrutivas são infecções causadas por bactérias que colonizam a superfície do dente, margem gengival e ambiente subgengival (Popova *et al.*, 2013).

*Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* são os agentes patogênicos mais comuns na periodontite em adultos.

Os  $\beta$ -lactâmicos são a classe de antibióticos em que a aquisição bacteriana de resistência é mais comum, sendo a primeira opção terapêutica dos médicos dentistas. A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos nos bacilos de Gram-negativo é adquirida principalmente através de plasmídeos que contêm genes codificantes de  $\beta$ -lactamases (Watkins e Bonomo, 2016).

Relatos de diferentes países mostram uma prevalência crescente de pacientes com bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases orais e subgengivais. O uso de antibióticos (definido como dose diária/100,000 habitantes) foi significativamente maior nos países mediterrâneos do que no resto da Europa. No entanto, em Portugal não existem dados sobre a resistência a antibióticos da flora oral. Além disso, pouco se sabe sobre a variedade de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases em isolados periodontais (Handal *et al.*, 2005).

A determinação da suscetibilidade antimicrobiana *in vitro* pode ser relevante em determinadas situações, como por exemplo, para monitorizar padrões de suscetibilidade e resistência na população e para ajudar na seleção do antibiótico apropriado num determinado tratamento dentário (Jacinto *et al.*, 2006). A introdução de técnicas baseadas em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) resultou no desenvolvimento de testes que podem detetar agentes patogénicos e genes específicos direta e rapidamente a partir de amostras clínicas. De facto, o PCR convencional já se tornou uma ferramenta importante em laboratórios de diagnóstico clínico e pesquisa (Iwahara *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi a identificação de genes de resistência a antibióticos em estirpes bacterianas previamente isoladas de infecções periodontais de adultos portugueses. Estas estirpes foram previamente identificadas como *P. intermedia* e *P. gingivalis*. Os genes analisados foram o *cfxA* e o *TEM* que conferem resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Estes são dos antibióticos mais frequentemente prescritos no tratamento da periodontite.

### **1.1. Microbioma humano**

No corpo humano habitam mais de 1 trilião de microrganismos e dentro destes existe uma variedade diversificada de microrganismos comensais, que desempenham um papel crucial para a saúde do indivíduo. Esses microrganismos ocupam habitats diferentes: gastro-intestinal, mucosas, aparelho genital e aparelho respiratório superior (Rajpoot *et al.*, 2018). A sua função passa pela ajuda na nutrição, no controlo de patógenos e na modulação do sistema imunológico do organismo. Portanto, o microbioma humano é valioso relativamente à saúde e na prevenção do aparecimento de patologias humanas (Cong e Zhang, 2018).

Não só os tipos e a abundância de microrganismos variam em diferentes zonas o corpo, como também podem diferir de indivíduo para indivíduo. O genoma dessa microbiota e seu ecossistema constituem a formação de um microbioma humano (Rajpoot *et al.*, 2018).

O microbioma humano contém um grupo colossal de microbiota como organismos procariontes (bactérias e archaea) , vírus e eucariontes (fungos), que têm relação direta com a saúde e determinadas doenças humanas (Cong e Zhang, 2018; Rajpoot *et al.*, 2018).

Vários estudos realizados sobre o microbioma humano revelam que a microbiota presente em indivíduos saudáveis e doentes é distinta. A alteração do microbioma é muitas vezes a razão

subjacente à sobre-expressão de genes que podem causar doenças complexas (Rajpoot *et al.*, 2018).

### **1.1.1. Microbioma Oral**

O microbioma oral é constituído na sua maioria por bactérias, desempenhando um papel importante na saúde/estado fisiológico da cavidade oral e no aparecimento de patologias orais. As comunidades microbianas orais variam desde a infância até à idade adulta (Rajpoot *et al.*, 2018).

Muitos dos microrganismos encontrados na cavidade oral vivem numa relação simbiótica com o hospedeiro, ou seja, com benefícios mútuos (Rajpoot *et al.*, 2018).

A cavidade oral é composta por um ambiente particular no qual mais de 700 espécies bacterianas comensais ou residentes podem armazenar e trocar seu material genético (Dupin *et al.*, 2015).

A saúde oral é o resultado de um equilíbrio entre a flora residente e os sistemas de defesa do hospedeiro. Quando existe saúde oral, estes microrganismos não causam quaisquer problemas, mas, em determinadas circunstâncias, podem tornar-se prejudiciais. Quando este equilíbrio é perturbado, as bactérias comensais e transitórias serão responsáveis por várias infecções locais tais como, infecções cariogénicas e periodontais, resultantes da acumulação de biofilmes bacterianos nas superfícies dentárias (Rajpoot *et al.*, 2018; Dupin *et al.*, 2015).

## **1.2. Doença periodontal**

A periodontite é uma das doenças orais mais comuns em adultos, representando um grande problema de saúde pública (Toy e Ulsu, 2019). A doença periodontal engloba diversas condições inflamatórias que afetam as estruturas de suporte dos dentes (gengiva, osso e ligamento periodontal), podendo, numa fase avançada, levar à perda de dentes e contribuir para a inflamação sistémica (Kinane *et al.*, 2017).

Segundo a *American Academy of Periodontology* (2015), esta doença é uma condição multifatorial, que requer a presença do biofilme (placa bacteriana) em níveis supra e subgingivais, dependendo a sua instalação e progressão da resposta imunológica do hospedeiro afetado (American Academy of Periodontology, 2015). Esta placa bacteriana, quando na superfície

supragengival do dente, pode levar ao aparecimento de gengivite que é uma forma mais ligeira da condição, caracterizada por inflamação gengival, hemorragia e alteração dos tecidos.

A periodontite, considerada como uma infecção de alta complexidade que atinge tecidos mais profundos do periodonto, apresenta bolsas com mais de 4 mm de profundidade acompanhadas por destruição do osso alveolar. O desenvolvimento destas “bolsas” patológicas torna o local propício para o aparecimento e manutenção de colônias bacterianas anaeróbias e Gram-negativas (American Academy of Periodontology, 1999).

Embora a existência de bactérias patogênicas seja necessária para o aparecimento da periodontite, a quantidade e qualidade destes agentes patogênicos não é sempre coerente com a severidade da doença ou mesmo suficiente para o seu aparecimento. Cada indivíduo pode ter uma reação individual e única resultante da suscetibilidade e predisposição do indivíduo para a doença (fatores genéticos, imunidade, patologias gerais) (Hart e Kornman, 1997; Walters e Lai, 2015; Toy e Uslu, 2019).

A resposta imuno-inflamatória é determinante para a suscetibilidade do hospedeiro à periodontite e é responsável pela maior parte da destruição tecidular.

Durante a persistência da infecção bacteriana e desequilíbrio homeostático prolongado, ocorre liberação de citocinas e enzimas pelos leucócitos do hospedeiro mediante a destruição do osso e tecido periodontal. Doenças sistêmicas como a diabetes, disfunção imunitária e fatores ambientais como o tabaco também podem contribuir para a desregulação do balanço homeostático (Walters e Lai, 2015).

O fator causal principal da doença periodontal é, ainda assim, a acumulação de placa bacteriana a nível supragengival que induz a inflamação gengival e subgengival consoante a sua progressão. O impacto na progressão em locais específicos ou de forma generalizada, varia entre os indivíduos de acordo com fatores de risco locais e sistêmicos (suscetibilidade do hospedeiro e a sua resposta imunológica) (Kinane *et al.*, 2017; Chapple *et al.* 2018).

Portanto, o início e a propagação da doença periodontal ocorrem por meio de uma disbiose da microbiota oral comensal, que interage com as defesas imunológicas do hospedeiro, levando a inflamação e conseqüentemente à doença (Kinane *et al.*, 2017).

Os fatores de risco locais ou predisponentes incluem a acumulação de placa num local específico pela ausência de remoção diária durante a higiene oral, e/ou a criação de um nicho biológico que facilita o aumento da acumulação de placa.

Alguns dos fatores que promovem a retenção de biofilme são, por exemplo a anatomia dentária que pode dificultar a remoção mecânica da placa, a presença de margens subgingivais de restaurações, e a xerostomia que leva à redução da limpeza de superfícies dentárias e ao aumento da inflamação gengival.

Os fatores de risco sistêmicos ou modificáveis são as características presentes num indivíduo, que influenciam negativamente a sua resposta imuno-inflamatória ao biofilme resultando numa inflamação exagerada. Entre estes fatores está o consumo de tabaco que influencia o sistema circulatório devido à vasoconstrição e fibrose provocada pelo cigarro.

Este efeito pode esconder os sinais clínicos da gengivite. Outros fatores como metabólicos (hiperglicemia), nutricionais (deficiência severa de vitamina C), uso de determinados agentes farmacológicos que interferem com o fluxo salivar ou com o sistema endócrino, alterações hormonais ou condições hematológicas, podem afetar a resposta inflamatória à presença do biofilme (Chapple *et al.*, 2018).

### **1.2.1. Espécies bacterianas patogénicas**

Embora se trate de uma patologia com etiologia multifatorial, há evidência científica que o fator preponderante para o desenvolvimento de periodontite seja o aumento dos níveis de microrganismos específicos de Gram-negativo anaeróbios estritos, no biofilme da placa subgingival. Este fator é muito relevante na iniciação e progressão da doença (Cortelli e Cortelli, 2003).

Entre os principais microrganismos de Gram-negativo anaeróbios estritos com interesse significativo na periodontite, *P. gingivalis* e *P. intermedia* são duas espécies predominantes, como podemos ver na Tabela 1 (Andrés *et al.*, 1998; Gatignol *et al.*, 2003; Mysak *et al.*, 2014).

O grupo de anaeróbios Gram-negativos com pigmentação negra é muito heterogéneo, compreendendo tanto espécies sacarolíticas como assacarolíticas (Lacerda, 2010). A redução do oxigénio no biofilme favorece o crescimento de espécies anaeróbias. Por esta razão, as bactérias



patogênicas dominantes na placa bacteriana são anaeróbias e assacarolíticas (Popova *et al.*, 2013). *Porphyromonas* incluindo *P. gingivalis* são espécies assacarolíticas e *Prevotella* são espécies sacarolíticas incluindo *P. intermedia* (Lacerda, 2010; Popova *et al.*, 2013).

**Tabela 1. Classificação de Socransky das bactérias subgingivais** (adaptado de Popova *et al.*, 2013).

Espécies Bacterianas	Complexo	
<i>Actinomyces</i> <i>Veillonella</i>	Roxo	São parte da flora comensal, mas podem provocar infecções oportunistas em caso de distúrbio do ecossistema.
<i>Capnocytophaga</i> <i>E.corrodens</i>	Verde	
<i>Streptococcus</i>	Amarelo	
<i>Campilobacter rectus</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Peptostreptococcus micros</i> <i>Prevotella intermedia</i>	Laranja	Periodontopatogénios suspeitos e aproximadamente associados ao complexo vermelho (Walters e Lai, 2015)
<i>Tannerella forsythia</i> <i>P.gingivalis</i> <i>Treponema denticola</i>	Vermelho	Fortemente associados com a iniciação e progressão da periodontite e periodontite crónica (Walters e Lai, 2015)
<i>A.actinomycescomitans</i> <i>Selenomonas</i>	Sem grupo	Fortemente associado à periodontite agressiva e em menor grau com a periodontite crónica (Walters e Lai 2015)  Periodontopatogénios suspeitos

Estudos microbianos sugerem que *P. gingivalis* deveria ser considerado o agente etiológico principal da periodontite. Esta espécie está fortemente associada com a patogénese da periodontite crónica (Dosseva-Panova *et al.*, 2014; Walters e Lai, 2015).

Estudos demonstram que o aparecimento da periodontite severa está menos relacionado, simplesmente, com a acumulação de placa bacteriana e má higienização, mas sim à presença de microrganismos específicos. Nos casos severos, os fatores determinantes são o predomínio dos microrganismos: *Aggregatibacter actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, *Bacteroides forsythus*, *P. intermedia*, *Treponema denticola*, *Campylobacter rectus*, *Fusobacterium nucleatum* (Cortelli e Cortelli, 2003). Estes patogénios possuem fatores de virulência que podem ultrapassar a resposta do hospedeiro e danificar os tecidos periodontais. (Popova *et al.*, 2013; Walters e Lai, 2015). A virulência de *Aggregatibacter actinomycescomitans* incluí a capacidade de invasão nos tecidos e a presença de leucotoxinas, proteases, colagenases, endotoxinas, fatores que induzem a reabsorção óssea e fatores inibidores de fibroblastos. *Porphyromonas gingivalis* apresenta uma

cápsula protetora contra fagócitos e produz proteases, collagenases, hemolisinas, endotoxinas, ácidos gordos,  $H_2S$  e  $NH_4$ . *Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* e *Fusobacterium nucleatum* têm ação proteolítica, destruindo imunoglobinas ou o sistema complemento. *Treponema denticola* apresenta mobilidade e tem ação proteolítica assim como *Campylobacter rectus*. No entanto, esta última também produz leucotoxinas (Popova *et al.*, 2013).

*P. intermedia* é um marcador significativo da doença periodontal destrutiva em adultos e uma das espécies mais frequentemente isoladas de pacientes encaminhados para tratamento de periodontite (Gatignol *et al.*, 2003).

As estirpes *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* e *P. intermedia* são capazes de invadir o epitélio das bolsas periodontais, o que dificulta a resposta do hospedeiro à sua eliminação, fazendo com que o tratamento periodontal convencional (polimento e raspagem radicular) não seja suficiente para o sucesso da sua eliminação.

As infecções persistentes por estas espécies bacterianas são frequentemente associadas com a periodontite crônica progressiva (Walters e Lai 2015).

### **1.2.2. Tratamento**

O principal objetivo da terapia periodontal é a prevenção da progressão da doença, de modo a reduzir o risco da perda dentária, diminuir os sintomas, mantendo conforto e função, diminuir a percepção da doença, possivelmente restabelecer a perda do tecido periodontal, manter um periodonto saudável devido à eliminação patológica do biofilme e à resolução do problema da inflamação (Walters e Lai., 2015; Graziani *et al.*, 2017). Quanto às intervenções terapêuticas, em primeiro lugar é realizado um tratamento não cirúrgico que inclui esclarecimento do paciente quanto a mudanças de comportamento ou estilo de vida, como: instruções de higiene oral e motivação do paciente, programa de cessação tabágica, ajuste da dieta, destartarização e polimento, e instrumentação subgingival (raspagem e alisamento radicular) de modo a remover a placa (Keestra *et al.*, 2014; Graziani *et al.*, 2018;).

O tratamento mecânico, por meio de raspagem e alisamento radicular, consiste na remoção terapêutica do biofilme microbiano de modo a que a inflamação desapareça (Kinane *et al.*, 2017; Teixeira, 2016). A sua finalidade é proporcionar condições de promoção da reparação dos tecidos, estabilizar a infecção e recuperar a condição de saúde (Teixeira, 2016).

O desbridamento mecânico é essencial no tratamento da periodontite e é o tratamento de primeira linha, mas em algumas situações clínicas refratárias o tratamento com antibióticos pode ser necessário. Nestes casos, as aminopenicilinas são frequentemente prescritas (Gatignol *et al.*, 2003).

Frequentemente, mesmo após o tratamento não cirúrgico, muitas bolsas periodontais, definidas como “residuais”, permanecem, o que pode comprometer a sobrevivência do dente e ser um fator de risco para a progressão da doença (Graziani *et al.*, 2018).

O uso sistêmico de antibióticos como adjuvante, imediatamente após o término do tratamento mecânico, pode aumentar o ganho de inserção clínica e a redução da profundidade de sondagem fornecida pelo tratamento periodontal não cirúrgico (Walters e Lai, 2015).

Praticamente todos os tipos de tratamento periodontal mecânico beneficiam da terapia química antimicrobiana adjuvante (Graziani *et al.*, 2018).

A antibioterapia é usada para limpar infecções isoladas que não responderam a outros tratamentos não-cirúrgicos, sendo usualmente prescritos antibióticos de largo espectro (Herrera *et al.*, 2008; Walters e Lai, 2015). A prescrição de antibióticos também ajuda a eliminar microrganismos presentes em locais inacessíveis aos instrumentos manuais como bolsas profundas, lesões de furca, túbulos dentinários e outros locais subgingivais (Abagaro *et al.*, 2004; Walter e Lai 2015; Teixeira, 2016;).

A maioria da literatura indica o tratamento com amoxicilina e metronidazol concomitante, ciprofloxacina e metronidazol concomitante, apenas metronidazol ou azitromicina, sendo a azitromicina geralmente menos eficaz, mas mais conveniente em termos de adesão e efeitos adversos (Graziani *et al.*, 2017).

As bactérias presentes no biofilme são consideravelmente mais difíceis de inibir com antibióticos do que bactérias dispersas (planctônicas), uma vez que a difusão dos antibióticos nos biofilmes pode estar comprometida ou pode haver menor taxa de crescimento bacteriano secundária pela privação de nutrientes no biofilme. No entanto, pode haver outros fatores contribuintes como a associação próxima das bactérias presentes nos biofilmes facilitar a transferência horizontal da informação genética que confere resistência aos antibióticos (Walters e Lai, 2015).

Desta forma, os antibióticos devem ser usados no tratamento da periodontite apenas em pacientes que já têm o biofilme subgingival interrompido pela raspagem e alisamento radicular (Walters e Lai, 2015).

Atualmente dispomos de um grande arsenal de fármacos de uso local ou sistêmico, que podem ser usados de forma adjunta no tratamento de patologias periodontais, com a finalidade de eliminar microrganismos virulentos e nocivos para os tecidos que circundam o dente (Meira *et al.*, 2007; Jepsen e Jepsen, 2016).

A amoxicilina, o metronidazol, azitromicina, tetraciclina e doxiciclina são capazes de atingir níveis que podem inibir eficientemente os patógenos periodontais quando estes crescem como células individuais (planctônicas) numa bolsa periodontal ou numa parede tecidual de uma bolsa (Walters e Lai, 2015).

Os compostos de azitromicina e tetraciclina são ativamente absorvidos e concentrados nas células epiteliais orais enquanto a amoxicilina e o metronidazol entram nas células através de difusão passiva (Walters e Lai, 2015).

A amoxicilina e o metronidazol apresentam um efeito bactericida, a azitromicina tem ação bactericida ou bacteriostática, a tetraciclina e a doxiciclina têm efeito bacteriostático (Walters e Lai, 2015).

Os  $\beta$ -lactâmicos (especialmente a amoxicilina) são usados como tratamento de primeira linha contra infecções da cavidade oral, devido ao seu largo espectro antimicrobiano, atividade bactericida, baixa incidência de efeitos adversos e custo-efetividade (Iwahara *et al.*, 2006; Dupin *et al.*, 2015;).

A amoxicilina é um antibiótico  $\beta$ -lactâmico pertencente à classe das penicilinas, possuindo um amplo espectro de ação bactericida de rápida ação e alta eficácia contra bactérias de Gram-positivas aeróbias e anaeróbias de Gram-negativas. É bem absorvida por via oral, é o antibiótico de maior utilização em prescrições odontológicas (Feres *et al.*, 2014; Dupin *et al.*, 2015; Valente, 2015). Este antibiótico pode ser usado em associação com o ácido clavulânico ou metronidazol tornando-se eficaz contra a ação de bactérias resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e aumentando o poder de ação da droga. (Feres *et al.*, 2014; Dupin *et al.*, 2015; Valente, 2015). O ácido clavulânico é um inibidor das  $\beta$ -lactamases, tendo a particularidade de se ligar quimicamente a estas inibindo irreversivelmente a sua ação hidrolítica. Esta associação permite que a amoxicilina

recupere a sua atividade antibacteriana perante estirpes produtoras de determinadas  $\beta$ -lactamases plasmídicas (Sousa, 2016; Charoo *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, a antibioterapia mais amplamente documentada nos relatórios clínicos tem sido a combinação de metronidazol e amoxicilina (Kaner *et al.*, 2007; Jepsen e Jepsen, 2016). Esta combinação é uma escolha racional para o tratamento adjuvante de pacientes que não são alérgicos aos  $\beta$ -lactâmicos. Esta combinação de dois agentes bactericidas tem potencial aumentado na inibição de estirpes bacterianas de largo espectro comparativamente a agentes individuais. Mais ainda, esta associação confere menor probabilidade de indução de resistências bacterianas aos antibióticos (Walters e Lai 2015).

O metronidazol tem um espectro de ação específico contra bactérias anaeróbias e tem efeito bactericida por interferir com a síntese do DNA da bactéria, causando morte celular. A amoxicilina é uma penicilina semissintética que inibe a síntese da parede celular bacteriana, provocando perda de sua integridade e levando a morte celular.

No caso de pacientes alérgicos à amoxicilina, o uso de apenas metronidazol ou azitromicina é uma boa escolha (Walters e Lai, 2015).

### **1.2.3. Mecanismos de resistência a $\beta$ -lactâmicos**

Esta classe de antibióticos é uma das mais frequentemente prescritas com intuito médico e dentário. No entanto, devido ao crescente desenvolvimento de resistências bacterianas, existe uma constante preocupação em relação à sua eficácia.

Estudos na literatura da área dentária têm abordado o assunto da suscetibilidade do patogénio aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e se certas espécies bacterianas, por exemplo, membros da microbiota oral como *Prevotella sp.*, podem contribuir para o estabelecimento e disseminação da resistência bacteriana em ambiente subgingival (Koukos *et al.*, 2016).

Atualmente conhecem-se quatro mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que podem ocorrer individualmente ou em associação que são: a impermeabilização da membrana externa; a modificação dos PBPs naturais ou aquisição de novos PBPs; hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico mediada por  $\beta$ -lactamases; e expressão de bombas de efluxo (Sousa, 2016).

A produção de  $\beta$ -lactamases constitui o principal mecanismo de resistência das bactérias de Gram negativo aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. As  $\beta$ -lactamases ao hidrolisar a ligação amida do anel  $\beta$ -lactâmico, inativam os antibióticos (Sousa, 2016).

Vários estudos abordaram a identificação de gêneros e espécies de bactérias na cavidade oral que são fontes de  $\beta$ -lactamases, um dos maiores mecanismos de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Koukos *et al.*, 2016). A alta prevalência de estirpes produtoras de  $\beta$ -lactamases foi demonstrada em *Prevotella sp.* (Gatignol *et al.*, 2003). Tem sido descrito que a combinação do biofilme e da presença de  $\beta$ -lactamases fazem com que as bactérias presentes no biofilme sejam menos suscetíveis a agentes antimicrobianos do que os seus homólogos planctônicos (Gatignol *et al.*, 2003).

A resistência bacteriana a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem sido atribuída a genes de resistência, presentes no DNA cromossomal ou num plasmídeo que pode ser transferido entre bactérias comensais e patogênicas (Handal *et al.*, 2005). Alguns destes genes são constitutivos, enquanto outros requerem indução (Maestre *et al.*, 2007).

As  $\beta$ -lactamases produzidas por bacilos Gram-negativos orais pertencem à classe A de Ambler (codificadas pelos genes *CepA*, *CblA*, *cfxA*, *CSP-1* e *TEM*), classe B (gene *cfiA*) ou classe D (gene *FUS-1*) (Watkins e Bonomo, 2016). *TEM* é o gene principal que confere resistência aos  $\beta$ -lactâmicos e, através de mutações, leva ao aparecimento de  $\beta$ -lactamases de espectro abrangente (Koukos *et al.*, 2016). As  $\beta$ -lactamases codificadas em plasmídeos estão presentes em muitas bactérias Gram-negativas, sendo a mais comum a enzima do tipo TEM originalmente isolada de *Escherichia coli* resistente à ampicilina.

Para além do gene *TEM*, estudos têm mostrado a existência de uma elevada prevalência de genes *cfxA* responsáveis pela produção de  $\beta$ -lactamases em *Prevotella* (Binta e Patel, 2016).

A resistência a antibióticos revela-se cada vez mais um problema sério e atual na prática médica e dentária. Os dados revelados na literatura indicam que a resistência a antibióticos na microbiota periodontal tem vindo a aumentar.

Isto deve-se ao uso intensivo e inadequado dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos na medicina e na medicina dentária. Esta conduta favorece a seleção de bactérias que adquirem resistência a outros antibióticos e faz com que os genes de resistência a antibióticos se espalhem gradualmente entre

outras espécies bacterianas patogênicas através da transferência horizontal de genes em populações bacterianas residentes ou transitórias (Andrade, 2013; Frieri e Boutin, 2017).

Por essa razão, as resistências aos antibióticos têm sido objeto de extensas investigações microbiológicas, bioquímicas e genéticas (Fosse *et al.*, 1999).

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Amostragem

A amostragem e identificação das espécies bacterianas foram realizadas em estudos prévios (Pina *et al.*, 2011).

A amostragem foi baseada em 50 pacientes tratados na clínica dentária da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal. Pacientes adultos entre 35 e 75 anos, diagnosticados com periodontite (marginal refratária) e que não receberam terapia antimicrobiana nos prévios 30 dias foram incluídos no estudo. A amostragem foi realizada com técnicas cirúrgicas assépticas. As amostras foram coletadas de acordo com Herrera *et al.* (2000) usando quatro pontos de papel estéreis sequenciais inseridos no sulco subgingival após a limpeza da placa supragengival e mantida no lugar por 60 s. Um fluído de transporte pré-reduzido esterilizado (RTF) foi usado para transportar amostras para o laboratório onde elas foram imediatamente processadas. O isolamento de bactérias pigmentadas negras foi realizado utilizando procedimentos de cultura: as amostras foram agitadas em vortex durante 60 s e diluídas em solução de PBS usando uma diluição de 10 vezes em série para  $10^{-3}$ . Um volume de 100  $\mu$ L de cada diluição foi espalhado em meio seletivo com 5% sangue de cavalo enriquecido com hemina (5mg/L) e vitamina K (1mg/L).

A incubação foi realizada a 37°C durante 14 dias, em atmosfera anaeróbica por Macs Mics (Whitley Jar Gassing System). A caracterização preliminar das espécies microbianas foi baseada na pigmentação e morfologia das colónias, coloração de Gram e produção de catalase.

A identificação bacteriana foi realizada utilizando o sistema API Rapid ID 32 A (bioMérieux) e confirmada por análise PCR (Pina *et al.*, 2011).

## 2.2. Análise por PCR para identificação de genes de resistência (*TEM* e *cfxA*)

O DNA foi extraído de acordo com Ashimoto *et al.* (1996).

Para identificação dos genes de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, o DNA (5  $\mu$ L) foi amplificado numa mistura de reação contendo 10  $\mu$ L de tampão PCR 5x, 4  $\mu$ L de  $MgCl_2$  25mM, 2  $\mu$ L de mistura de dNTP 10 mM, 5  $\mu$ L de cada *primer* 10  $\mu$ M e 0,25  $\mu$ L de Taq DNA polimerase num volume total de 50  $\mu$ L (Koukos *et al.*, 2015).

Os *primers* usados para a amplificação do gene *TEM* foram 5'-AGATCAGTTGGGTGCACGAG-3' e 5'-CAGTGCTGCAATGATACCGC-3' (Koukos *et al.*, 2015). O PCR foi realizado de acordo com Koukos *et al.* (2015) como indicado: 5 minutos a 94°C; 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 62°C e 1 minuto a 72°C; extensão final de 10 minutos a 72°.

Os *primers* utilizados para a identificação do gene *cfxA* foram 5'-GCAAGTGCAGTTTAAGATT-3' e 5'-GCTTTAGTTTGCATTTTCATC-3' (Handal *et al.*, 2005). O PCR foi realizado de acordo com Handal *et al.* (2005) como indicado: 5 minutos a 94°C; 25 ciclos 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 58°C e 30 segundos a 72°C; extensão final de 10 minutos a 72°C.

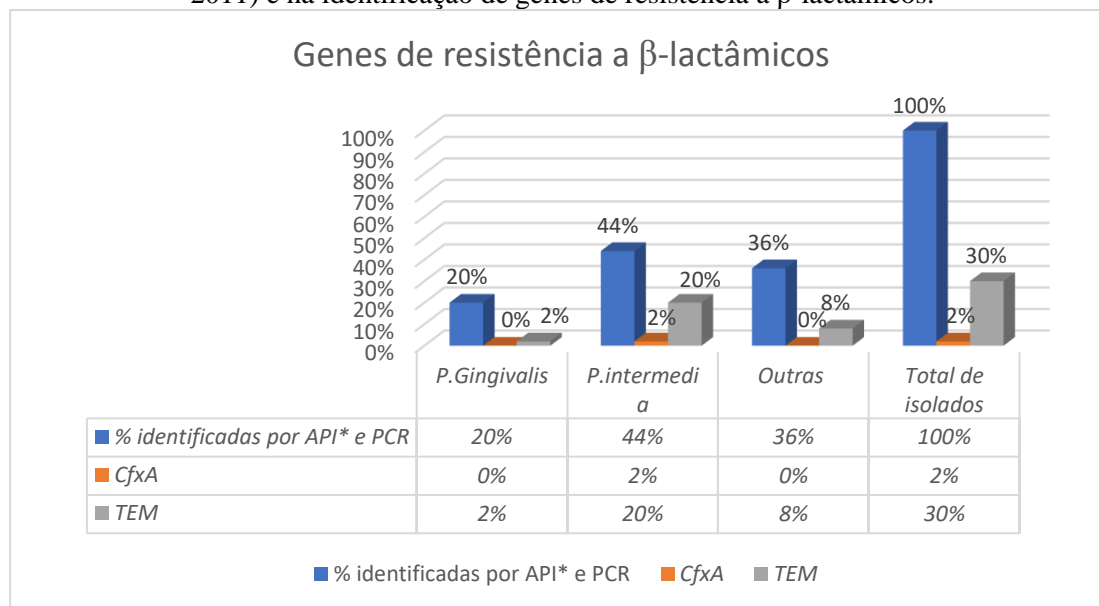
Os produtos PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%.

### III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As estirpes bacterianas negras pigmentadas isoladas foram identificadas por técnicas convencionais e moleculares num estudo anterior (Pina *et al.*, 2011). Neste trabalho foi estudada a presença de genes de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Gráfico 1). As estirpes previamente isoladas foram identificadas como *P. intermedia* que representavam 44% do total de isolados e *P. gingivalis* que representavam 20% do total de isolados. Os restantes 36% correspondiam a outras espécies de pigmentação negra não identificadas (Gráfico 1) (Pina *et al.*, 2011).

A análise de genes de resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (*cfxA* e *TEM*) mostrou que 32% do total de isolados continham um dos genes analisados. Destes, 2% correspondiam à presença do gene *cfxA*, tendo sido identificados como *P. intermedia*. Os restantes 30% eram estirpes que continham o gene *TEM*. A maioria das estirpes que continham o gene *TEM* tinham sido identificadas como *P. intermedia* (20%) enquanto 8% pertenciam a espécies de pigmentação negra não identificadas e 2% correspondiam a *P. gingivalis* (Gráfico 1).



**Gráfico 1. Resultados obtidos na identificação de estirpes isoladas usando API e PCR (Pina *et al.*, 2011) e na identificação de genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos.**

\*(Pina *et al.*, 2011)

Os genes de resistência identificados neste estudo estão de acordo com a maioria dos estudos publicados que refere um elevado nível de resistência a  $\beta$ -lactâmicos na *P. intermedia* (Dubreuil *et al.*, 2003; Maestre *et al.*, 2007), ou baixas prevalências de resistências (Fosse *et al.*, 1999; Mättö *et al.*, 1999). No entanto, outros estudos também observaram resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Porphyromonas sp.* (Montagner *et al.*, 2014; Binta e Patel, 2016), que não foi detetada neste estudo. Em concordância com este trabalho, estudos indicam alta prevalência do gene *TEM* (48-71%) em amostras de periodontite (Ioannidis *et al.*, 2009; Koukos *et al.*, 2016).

Tem sido relatado que a presença dos genes *cfxA* e *cfxA2* ocorre em 100% das estirpes  $\beta$ -lactamase positivas de *Prevotella* de pacientes americanos e noruegueses com doença periodontal (Ashimoto *et al.*, 1996). Investigadores franceses também demonstraram 100% de prevalência de genes de resistência em estirpes de *Prevotella*  $\beta$ -lactamase positivas (Iwahara *et al.*, 2006).

A resistência a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem sido associada a resistência a tetraciclinas (genes *Tet*) e a eritromicina (gene *erm*) (Falagas e Siakavellas, 2000). Um estudo com anaeróbios orais de pacientes com periodontite identificou uma prevalência elevada do gene *cfxA* em estirpes de *Prevotella* resistentes a aminopenicilina na placa subgingival (Handal *et al.*, 2005).

O trabalho apresentado neste estudo, foi complementado com análise de outros genes de resistência a tetraciclinas (*TetQ* e *TetM*), eritromicina (*ermB* e *mefA*) e metronidazol (*nim*), o qual foi tema da tese de mestrado de um outro aluno. Da mesma forma, foi observado neste trabalho

que estirpes com genes de resistência a tetraciclina (*TetQ* ou *TetM*) também continham o gene *TEM*. Além disso, o gene *ermB* foi detectado em estirpes que também continham os genes *TEM* e *TetM*. Estes resultados podem indicar uma transferência combinada de genes resistentes a antibióticos.

#### **IV. CONCLUSÃO**

É possível observar neste estudo uma elevada resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em infecções periodontais. Dos genes que codificam as  $\beta$ -lactamases, o gene *TEM* foi o mais prevalente e correspondia na sua maioria a estirpes de *P. intermedia* (20%). Apenas uma estirpe de *P. gingivalis* apresentava um dos genes de resistência analisados (*TEM*). *P. intermedia* em conjunto com *P. gingivalis* são espécies de pigmentação negra frequentemente isoladas de infecções periodontais, sendo a *P. intermedia* o isolado anaeróbio mais prevalente.

A presença de genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos nestas estirpes está provavelmente relacionada com o facto destes antibióticos serem o tratamento de primeira linha quando se pretende controlar infecções periodontais com resistência ao tratamento não-cirúrgico. Foi observado também que as espécies bacterianas orais também contêm outros genes de resistência, como a tetraciclina e eritromicina devido, hipoteticamente, a mecanismos de transferência de material genético.

A prescrição empírica de antibióticos como terapia estratégica para a periodontite, deve ser evitada, de forma a travar o corrente aumento da prevalência da resistência antibiótica entre estirpes bacterianas isoladas de infecções periodontais. É importante salientar que o conhecimento da prevalência de genes de resistência a antibióticos poderá ter impacto nas prescrições clínicas e aumentar a consciência para o uso apropriado dos antibióticos.

#### **Limitações do estudo**

As divergências nas frequências bacterianas observadas neste estudo e noutras pesquisas podem ser explicadas pelas diferenças geográficas e divergências nas amostras (Fosse *et al.*, 1999; Dubreuil *et al.*, 2003), assim como pela dimensão da amostragem.

#### **Pesquisas futuras**

Estes resultados devem ser confirmados com uma maior coleção de amostras isoladas de infecções periodontais e com a pesquisa de mais genes de resistência.

## V. BIBLIOGRAFIA

- Abagaro, L. F., Jamelli, S.R., e Gomes, V.B. (2004). Análise da metodologia utilizada nos ensaios clínicos sobre a administração local de antimicrobianos no tratamento da doença periodontal. *International Journal of Dentistry*, 3(2), pp. 339-344.
- American Academy of Periodontology (1999). International Workshop for a Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), pp. 53-54.
- American Academy of Periodontology (2015). American Academy of Periodontology Task Force Report on the Update to the 1999 Classification of Periodontal Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 86(7), pp. 835-838.
- Andrade, I. P. (2013). O uso de antibióticos sistêmicos na terapia periodontal: revisão de literatura. Monografia apresentada como requisito para obtenção de Título de Especialista em Periodontia. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Andrés, M. T. *et al.* (1998). Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* spp. isolated in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(11), pp. 3022-3023.
- Ashimoto, A. *et al.* (1996). Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunology*, 11, pp. 266-273.
- Binta, B., e Patel, M. (2016). Detection of *cfxA2*, *cfxA3*, and *cfxA6* genes in beta-lactamase producing oral anaerobes. *Journal of Applied Oral Sciences*, 24, pp. 142-147.
- Chapple, I. L. C. *et al.* (2018). 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 Peri-Implant Diseases and Conditions. *Journal of Periodontology*, 89, pp. S74-S84.
- Charoo, N. A., Rahman, Z., e Ali, A. A. (2018). Is the demonstration of bioequivalence for clavulanic acid required in amoxicillin-clavulanic acid orally administered immediate-release products? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(7), pp. 883-892.

- Cong, J., e Zhang, X. (2018). How human microbiome talks to health and disease. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37(9), pp. 1595-1601.
- Cortelli, J. R., e Cortelli, S. C. (2003). Periodontite crônica e agressiva: Prevalência subgingival e frequência de ocorrência de patógenos periodontais. *Revista Biociências*, 9(2), pp.91-96.
- Dosseva-Panova, V. T., Popova, C. L. e Panov, V. E. (2014). Subgingival microbial profile and production of proinflammatory cytokines in chronic periodontitis. *Folia medica*, 56(3), pp. 152-160.
- Dubreuil, L. *et al.* (2003).  $\beta$ -lactamase production in *Prevotella* and in vitro susceptibilities to selected  $\beta$ -lactam antibiotics. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21, pp. 267-273.
- Dupin, C. *et al.* (2015). Oral Gram-negative anaerobic bacilli as a reservoir of  $\beta$ -lactam resistance genes facilitating infections with multiresistant bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents*, pp. 99-105.
- Falagas, M. E., e Siakavellas, E. (2000). *Bacteroides*, *Prevotella* and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 15, pp. 1-9.
- Feres, M. *et al.* (2014). Systemic antibiotics in the treatment of periodontitis, *Periodontology 2000*, 67(1), pp. 131-186.
- Fosse, T. *et al.* (1999). Prevalence of  $\beta$ -lactamase-producing strains among 149 anaerobic gram-negative rods isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiology and Immunology*, 14, pp. 352-357.
- Frieri, M., Kumar, K., e Boutin, A. (2017). Antibiotic resistance. *Journal of Infection and Public Health*, 10(4), pp. 369-378.
- Gatignol, J. P. *et al.* (2003). Comparison of laboratory methods for detecting lactamase-positive strains in the species *Prevotella intermedia sensu lato* isolated from periodontal pockets. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 22(6), pp. 389-391.
- Graziani, F. *et al.* (2017). Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontology 2000*, 75(1), pp. 152-188.

- Graziani, F. *et al.* (2018). Surgical treatment of the residual periodontal pocket. *Periodontology* 2000, 76(1), pp. 150-163.
- Handal, T. *et al.* (2005). Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiology Letters*, 242, pp. 319-324.
- Hart, T. C., e Kornman, K. S. (1997). Genetic facts in the pathogenesis of periodontitis. *Periodontology* 2000, 14, pp. 202-215.
- Herrera, D. *et al.* (2000). Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(7), pp. 520-525.
- Herrera, D. *et al.* (2008). Antimicrobial therapy in periodontitis: the use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8 Suppl), pp. 45-66.
- Ioannidis, I. *et al.* (2009). Prevalence of tetM, tetQ, nim and blaTEM genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *Journal of Clinical Periodontology*, 36, pp. 569-574.
- Iwahara, K. *et al.* (2006). Detection of cfxA and cfxA2, the  $\beta$ -lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, pp. 172-176.
- Jacinto, R. C. *et al.* (2006). Incidence and antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *International Endodontic Journal*, 39, pp. 62-70.
- Jepsen, K., e Jepsen, S. (2016). Antibiotics/antimicrobials: Systemic and local administration in the therapy of mild to moderately advanced periodontitis. *Periodontology* 2000, 71(1), pp. 82-112.
- Kaner, D. (2007). Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(10), pp. 880-891.

- Keestra, J. A. J. *et al.* (2014). Non-surgical periodontal therapy with systemic antibiotics in patients with untreated chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Periodontal Research*, 50 (3), pp. 294-314.
- Kinane, D. F., Stathopoulou, P. G. e Papapanou, P. N. (2017). Periodontal diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), pp. 17038.
- Koukos, G., *et al* (2015). Prevalence of antibiotic resistance genes in subjects with successful and failing dental implants. A pilot study. *The Open Dentistry Journal*, 8, pp. 257-263.
- Koukos, G. *et al.* (2016). Prevalence of  $\beta$ -lactam (bla TEM) and Metronidazole (nim) resistance genes in the oral cavity of Greek subjects. *The Open Dentistry Journal*, 10, pp. 89-98.
- Lacerda, P. F. (2010). *Etiopatologia das alterações pulpoperiorradiculares*. Monografia de conclusão do curso de especialização em Endodontia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. Minas Gerais. Brasil.
- La Fauci, V. e Alessi, V. (2018). Antibiotic resistance: Where are we going? *Annali di Igiene*, 30(4), pp. 52-57.
- Maestre, J. R. *et al.* (2007). Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Revista Española de Quimioterapia*, 20, pp. 61-67.
- Mättö, J. *et al.* (1999).  $\beta$ -lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, pp. 2383-2388.
- Meira, A. L. T. *et al.* (2007). Uso de antimicrobianos locais em periodontia: uma abordagem crítica. *Periodontia*, 17(1), pp. 92-98.
- Montagner, F. *et al.* (2014). Beta-lactamic resistance profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* species isolated from acute endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 40, pp. 339-344.
- Mysak, J. *et al.* (2014). *Porphyromonas gingivalis*: Major periodontopathic pathogen overview. *Journal of Immunology Research*, 2014, pp. 476068.

- Patini, R. *et al.* (2020). The effect of different antibiotic regimens on bacterial resistance: a systematic review. *Antibiotics*, 9(1), pp. 22.
- Pina, P. *et al.* (2011). Antimicrobial susceptibilities of Porphyromonas and Prevotella species isolated from periodontitis infections in the north of Portugal. In: IV International Conference on Environmental, Industrial and applied Microbiology (BIOMICROWORLD2011). Málaga, Spain. *Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges*. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, pp. 492-494.
- Popova, C., Dosseva-Panova, V. e Panov, V. (2013). Microbiology of periodontal diseases. A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(3), pp. 3754-3759.
- Rajpoot, M. *et al.* (2018). Understanding the microbiome: emerging biomarkers for exploiting the microbiota for personalized medicine against cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 52(Pt 1), pp. 1-8.
- Sousa, J. C. *et al.* (2016). Antibióticos. Edições Universidade Fernando Pessoa. Porto, Portugal, volume I, cap 6.
- Teixeira, R. O. (2016). O uso de antimicrobianos na terapia periodontal: revisão. Artigo apresentado no curso de graduação em como requisito para obtenção do título de Cirurgião Dentista. Odontologia da Faculdade São Lucas. Porto Velho. Brasil.
- Toy, V.E., Uslu, M.O. (2019). Do genetic polymorphisms affect susceptibility to periodontal disease? A literature review. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 22, pp. 445-453.
- Valente, A. C. (2015). O uso sistémico de antibióticos no tratamento da doença periodontal. Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências da Saúde.
- Walters, J. e Lai, P.C. (2015). Should antibiotics be prescribed to treat chronic periodontitis? *Dental Clinics of North America*, 59(4), pp. 919-933.
- Watkins, R. R., e Bonomo, R. A. (2016). Overview: global and local impact of antibiotic resistance. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), pp. 313-322.

# Prevalence of antibiotic ( $\beta$ -lactams, tetracycline, metronidazole, erythromycin) resistance genes in periodontic infections

Daniel Freitas<sup>1</sup>, Lara Gonçalves<sup>1</sup>, Maria João Coelho<sup>1,2</sup>, Maria Pia Ferraz<sup>1,2</sup>, Ricardo Magalhães<sup>1,2</sup>, Cristina Pina<sup>1,2</sup> and Inês Lopes Cardoso<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Health Sciences Faculty, Fernando Pessoa University, Porto, Portugal

<sup>2</sup>FP-ENAS/CEBIMED, Energy, Environment and Health Research Unit/Biomedical Research Centre, University Fernando Pessoa, Porto, Portugal

## Abstract

**Objective:** *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* are thought to be pathogens in adult periodontitis. Antibiotherapy is usually needed in the treatment of periodontitis being often prescribed empirically. To allow prescription of a specific antibiotic treatment, identification of resistance genes should be performed. The aim of this study was the identification of the presence of *TetM*, *TetQ*, *TEM*, *cfxA*, *MefA*, *ErmB* and *Nim* resistance genes in previously identified *P. intermedia* and *P. gingivalis* isolated from samples collected from periodontal infections.

**Method:** PCR was used for the identification of *TetM*, *TetQ*, *TEM*, *cfxA*, *MefA*, *ErmB* and *Nim* resistance genes in strains isolated from samples collected from periodontal infections.

**Results:** It was seen that 8% of isolates had one of the tested tetracycline resistance genes. A total of 32% of  $\beta$ -lactamase resistance genes was observed in isolated strains. It was also observed that 2% of isolates had one of the analysed erythromycin resistance genes. None of the isolates showed the presence of the metronidazole resistance gene.

**Conclusions:** Most strains harboring  $\beta$ -lactamase resistance genes had been previously identified as *P. intermedia*. No tetracycline resistance gene and a very low percentage of  $\beta$ -lactamase resistance genes were observed in *P. gingivalis* strains.

## Introduction

The oral cavity constitutes a special environment in which more than 700 commensal or resident bacterial species, may store and exchange their genetic material [1]. Two of the most common human diseases (caries and inflammatory periodontal disease) result from the accumulation of bacterial biofilms (plaques) on tooth surfaces. Oral health is the result of a balance between the resident flora and defence systems of the host. When this balance is disturbed, commensal and transient bacteria will be responsible for various local infections [1]. Black-pigmented, Gram negative oral anaerobes such as *Porphyromonas gingivalis* and *Prevotella intermedia* are thought to be pathogens in adult periodontitis [2,3]. These bacteria are frequently isolated from patients under periodontitis treatment. Odontogenic local infections require surgical treatment and, if required, a probabilistic antibiotherapy is needed that is effective on most recognized oral pathogens [4].

Treatment of this infection is primarily probabilistic, favoring  $\beta$ -lactam, macrolide-lincosamide-streptogramin and nitromidazole antibiotic families.  $\beta$ -Lactams (especially amoxicillin) are used as the first-line treatment against infections of the oral cavity, because of their suitable antimicrobial spectrum, bactericidal activity, low incidence of adverse effects, and cost-effectiveness [1,5]. Intensive or inadequate use of  $\beta$ -lactam antibiotics in medicine and dentistry favors the selection of bacteria that have acquired resistance to other antibiotics [1].

In most cases, antibiotic prescription is empirical and based on the clinical condition of the patient. As a result, treatment is often inappropriate and leads to the development of bacterial resistance and

even multiple resistances [6].  $\beta$ -Lactams (especially amoxicillin) are used as the first-line treatment against infections of the oral cavity, but, the intensive or inadequate use of  $\beta$ -lactam antibiotics in medicine and dentistry favors the selection of bacteria that have acquired resistance to other antibiotics. Antibiotic resistance genes gradually spread among other pathogenic bacterial species by horizontal gene transfer in resident or transient bacterial populations. So, antibiotic resistance has become a serious problem in nowadays medical and dental practice, and data from the literature suggest that antibiotic resistance in the periodontal microbiota has increased.

The main mechanism of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in the oral cavity appears to be production of a  $\beta$ -lactamase. This enzyme is frequently detected in diseased periodontal sites and appears to be positively correlated with increased periodontal pocket depth.

For this reason, antibiotic resistances have been under extensive microbiological, biochemical and genetic investigations [4].

\*Correspondence to: Inês Lopes Cardoso, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Tel: 351 225071300; E-mail: mic@ufp.edu.pt

**Key words:** antibiotic resistance genes, periodontic infections,  $\beta$ -lactamase, tetracycline, metronidazole, erythromycin

**Received:** October 09, 2019; **Accepted:** October 29, 2019; **Published:** November 01, 2019



$\beta$ -Lactamases produced by oral Gram-negative bacilli belong to Ambler class A (CepA, CblA, CfxA, CSP-1 and TEM), class B (CfiA) or class D (FUS-1).

Reports from different countries show an increasing prevalence of patients with oral and subgingival  $\beta$ -lactamase producing bacteria. The use of antibiotics (defined as daily doses/100 000 inhabitants) was significantly higher in Mediterranean countries than in the rest of Europe [7,8]. However, in Portugal there is no data concerning antibiotic resistance of oral flora. Little is known about the variety of  $\beta$ -lactamases in periodontal isolates [9].

The determination of *in vitro* antimicrobial susceptibility can be important in certain situations, for example, to monitor patterns of susceptibility and resistance in the population and to help in the selection of the appropriate antibiotic in dentistry treatment [10]. Although antibiotic sensitivity can be determined from standard cultural microbiological analysis, this generally takes several days due to the slow growth of fastidious anaerobic bacteria. Since infection can spread rapidly and cause severe complications such as sepsis and obstruction of the airway, such a delay can prove problematic and undesirable. The introduction of PCR-based techniques has resulted in the development of tests that can detect specific pathogens and genes directly and rapidly from clinical samples. Indeed, conventional PCR has already become an important tool in clinical diagnostic and research laboratories [5].

The main goal of this study was to identify the presence of antibiotic resistance genes in strains isolated from periodontal infections. These strains had been previously identified as *P. intermedia* and *P. gingivalis*. Analyzed genes were *TetM* and *TetQ* genes that confer resistance to tetracycline, *cfxA* and *TEM* genes giving resistance to  $\beta$ -lactamases, *nim* gene responsible for metronidazole resistance and *ermB* and *mefA* genes involved in erythromycin resistance. These correspond to the most frequently prescribed antibiotics for periodontitis treatment.

## Methods

This study was based on 50 adult patients with ages ranging from 35 to 75 years old, having a diagnosis of periodontitis and that did not receive antimicrobial therapy in the previous 30 days. The sampling was done in a clinical of oral medicine in a Portuguese University School.

Isolation and identification of bacterial strains had been previously performed [11].

For the identification of the tetracycline resistance genes, DNA (5  $\mu$ L) was amplified in a reaction mixture containing 10  $\mu$ L of 5x PCR buffer, 3  $\mu$ L of  $MgCl_2$  25mM, 1  $\mu$ L of dNTP mixture 10 mM, 2.5  $\mu$ L of each primer 10  $\mu$ M and 0.25  $\mu$ L Taq polymerase in a total volume of 50  $\mu$ L [12].

Primers used for identification of the *TetM* gene were 5'-GACAGCCAGGACATATGG-3' and 5'-TGCTTCTCTTGTTCGAG-3' [12]. PCR was performed according with Koukos, *et al.* [12] as followed: 5 minutes at 94°C; 37 cycles of 30 seconds at 94°C, 1 minute at 55°C and 90 seconds at 72°C; final extension for 10 minutes at 72°C.

Primers used for identification of the *TetQ* gene were 5'-GGCT-TCTACGACATCTATTA-3' and 5'-CATCAACATTTATCTCTCTG-3' [12]. PCR was performed according with Koukos, *et al.* [12] as followed: 5 minutes at 94°C; 37 cycles of 30 seconds at 94°C, 1 minute at 50°C and 160 seconds at 72°C; final extension for 10 minutes at 72°C.

For identification of the *TEM* gene, DNA (5  $\mu$ L) was amplified in a reaction mixture containing 10  $\mu$ L of 5x PCR buffer, 4  $\mu$ L of  $MgCl_2$  25mM, 2  $\mu$ L of dNTP mixture 10 mM, 5  $\mu$ L of each primer 10  $\mu$ M and 0.25  $\mu$ L Taq polymerase in a total volume of 50  $\mu$ L [12]. Primers used for identification of the *TEM* gene were 5'-AGATCAGTTGGTGCACGAG-3' and 5'-CAGTGCTGCAATGATACCGC-3' [12]. PCR was performed according with Koukos, *et al.* [12] as followed: 5 minutes at 94°C; 35 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 62°C and 1 minute at 72°C; final extension for 10 minutes at 72°C.

For identification of the *cfxA* gene, DNA (5  $\mu$ L) was amplified in a reaction mixture containing 10  $\mu$ L of 5x PCR buffer, 4  $\mu$ L of dNTP mixture 10 mM, 5  $\mu$ L of each primer 10  $\mu$ M and 0.25  $\mu$ L Taq polymerase in a total volume of 50  $\mu$ L. Primers used for identification of the *cfxA* gene were 5'-GCAAGTGCAGTTAAGATT-3' and 5'-GCTTTAGTTTGCATTTTCATC-3' [9]. PCR was performed according with Handal, *et al.* [9] as followed: 5 minutes at 94°C; 25 cycles of 1 minute at 94°C, 1 minute at 58°C and 30 seconds at 72°C; final extension for 10 minutes at 72°C.

For identification of the *nim* gene, DNA (5  $\mu$ L) was amplified in a reaction mixture containing 10  $\mu$ L of 5x PCR buffer, 3  $\mu$ L of  $MgCl_2$  25mM, 1  $\mu$ L of dNTP mixture 10 mM, 5  $\mu$ L of each primer 10  $\mu$ M and 0.25  $\mu$ L Taq polymerase in a total volume of 50  $\mu$ L [12]. Primers used for identification of the *nim* gene were 5'-ATGTTTACAGAGAAATGCGGCGTAAGCG-3' and 5'-GCTTCCTTGCTGTGTCATGTGCTC-3' [12]. PCR was performed according with Koukos, *et al.* [12] as followed: 5 minutes at 94°C; 35 cycles of 30 seconds at 94°C, 1 minute at 62°C and 1 minute at 72°C; final extension for 10 minutes at 72°C.

For identification of the *ermB* and *mefA* genes, DNA (1  $\mu$ L) was amplified in a reaction mixture containing 4  $\mu$ L of 5x PCR buffer, 0.4  $\mu$ L of  $MgCl_2$  25mM, 0.8  $\mu$ L of dNTP mixture 10 mM, 1  $\mu$ L of each primer 10  $\mu$ M and 0.25  $\mu$ L Taq polymerase in a total volume of 20  $\mu$ L [13]. Primers used for identification of the *ermB* gene were 5'-CGTACCTTGATATTCACCG-3' and 5'-GTAAACAGTTGACGATATTC-3' [13]. Primers used for identification of the *mefA* gene were 5'-CCCAGCT-TAGGTATACGTAC-3' and 5'-CTGTATGGAGCTACCTGTCTGG-3' [13]. PCR was performed according with Ubukata, Iwata & Sunakawa [14] as followed: 5 minutes at 94°C; 30 cycles of 20 seconds at 94°C, 20 seconds at 52°C and 15 seconds at 72°C; final extension for 10 minutes at 72°C.

PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel.

## Results and Discussion

Concerning all tested antibiotic resistance genes, it was observed a total of 42% of antibiotic resistance genes in strains isolated from periodontal infections (Table 1). These results agree with most studies of other countries that show high levels of antibiotic resistance among anaerobes [12,15-18].

Analysis of  $\beta$ -lactamase resistance genes showed that 32% of total isolates harboured one of the analysed genes. From these, 2% corresponded to the presence of the *cfxA* gene. These were identified as *P. intermedia*. The remaining 30% were strains harbouring the *TEM* gene. Most strains having the *TEM* gene were identified as *Prevotella intermedia* (20%) while 8% belonged to unidentified black-pigmented species and 2% were *P. gingivalis* (Table 1).

Resistance genes identified in this study are in agreement with most published studies that report a high level of  $\beta$ -lactamase resistance in *P. intermedia* [16,17], or lower prevalences of resistance [4,19]. However,

# Prevalência de genes de resistência a antibióticos em infecções periodontais: $\beta$ -lactâmicos

Freitas D (2019) Prevalence of antibiotic ( $\beta$ -lactams, tetracycline, metronidazole, erythromycin) resistance genes in periodontic infections

**Table 1.** Results obtained in the identification of antibiotic resistance genes in strains previously isolated from periodontal infections

Antibiotic Resistance Genes								
Strain	% identified by PCR <sup>11</sup>	Tetracycline		$\beta$ -Lactamases		Erythromycin		Metronidazole
		<i>TetQ</i>	<i>TetM</i>	<i>CfxA</i>	<i>TEM</i>	<i>ErmB</i>	<i>MefA</i>	<i>Nim</i>
<i>P. gingivalis</i>	20%	0%	0%	0%	2%	0%	0%	0%
<i>P. intermedia</i>	44%	4%	2%	2%	20%	2%	0%	0%
<b>Other black-pigmented</b>	36%	0%	2%	0%	8%	0%	0%	0%
<b>Total isolates</b>	100%	4%	4%	2%	30%	2%	0%	0%

other studies also observe  $\beta$ -lactamase resistance in *Porphyromonas* sp. [20,21], that was not detected in this study.

In agreement with this work, studies report high prevalence of the *TEM* gene (48-71%) in periodontitis samples [22,23].

It has been reported that *cfxA* and *cfxA2* occur in 100% of  $\beta$ -lactamase-positive *Prevotella* strains from American and Norwegian patients with periodontal disease [24]. French investigators have also demonstrated a 100% prevalence of the resistance genes in  $\beta$ -lactamase-positive *Prevotella* strains [5]. Some antibiotics, such as amoxicillin-clavulanate, cefmetazole, clindamycin and metronidazole, have been demonstrated to be effective for treatment of  $\beta$ -lactamase-positive *Prevotella* infections.

$\beta$ -Lactamases vary considerably from one organism to another. Some are chromosomally-encoded while others are plasmid-mediated; some are constitutive while others require induction [16]. The presence of resistance genes on plasmids and transposable elements allows resistance to be transferred even between genetically distantly related organisms [9].

Plasmid-specified  $\beta$ -lactamases are present in many Gram-negative bacteria. The most common of these is the *TEM*-type enzyme originally isolated from ampicillin-resistant *Escherichia coli*.

Concerning tetracycline resistance genes, it was observed that 8% of isolated strains had one of the analysed tetracycline resistance genes. The *TetQ* gene was detected in 4% of total isolates. The *TetQ* harbouring strains were all identified as *P. intermedia*. The *TetM* gene was also detected in 4% of total isolates, corresponding 1% of these to *P. intermedia* strains. The remaining 3% belonged to other black-pigmented unidentified strains. None of these tetracycline resistance genes was present in *P. gingivalis* strains (Table 1).

Ioannidis, *et al.* [22] also observed high levels of *tetQ* (70-80%) and *tetM* (76-82%) genes in samples collected from periodontal infections.

Moreover, unlike our data, another study [12] on implants showed that the most abundant genes were the tetracycline resistance genes. Collins, *et al.* [18] also detected seven tetracycline resistance genes in bacterial isolates from chronic periodontitis, including the *tetQ* gene present in 72% of tested patients.

Isolated strains were also tested for the presence of the erythromycin resistance genes *ermB* and *mefA*. Only 2% of total isolates showed the presence of the *ermB* gene and none harboured the *mefA* gene (Table 1).

The *nim* gene, responsible for metronidazole resistance, was not detected in any of the isolates. Although, in accordance with this work, some studies did not detect the *nim* gene in collected samples [22,23], Xie, *et al.* [25] reported the presence of this gene in strains isolated from periodontal abscesses.

$\beta$ -Lactam resistance has been associated with resistance to tetracycline (*Tet* genes) and to erythromycin (*erm* genes) [26]. A recent

study of oral anaerobes from patients with periodontitis identified a high prevalence (97%) of *CfxA*  $\beta$ -lactamase production by aminopenicillin-resistant *Prevotella* in subgingival plaque [9].

In the same way, it was observed in this work that strains with tetracycline resistance genes (*TetQ* or *TetM*) also harboured the *TEM* gene. Moreover, the *ermB* gene was detected in strains that also had the *TEM* and the *TetM* genes. These results may indicate a combined transfer of antibiotic resistance genes. However, due to the sampling size, these results should be confirmed with a bigger collection of sample isolates from periodontal infections.

Divergence in bacterial frequencies observed in this study and in other reports might be explained by geographical differences and divergences in sampling [4,17] as well as sample size. This study should be enlarged to the analysis of a bigger number of patients carrying periodontal infections.

Due to the increasing prevalence of antibiotic resistance among bacterial strains isolated from periodontal infections, the empirical prescription of these antibiotics as a therapy strategy for periodontitis should be avoided.

This study contributes to the knowledge on subgingival microbiota and its resistance genes present in periodontal infections. Knowing the prevalence of resistance genes can have impact on their clinical prescription and might raise awareness to the appropriate use of antibiotics.

## Conclusion

Our results showed that the genes coding for  $\beta$ -lactamases were the most prevalent resistance genes found in periodontal infections, with high prevalence of the *TEM* gene. Most resistance genes were found in strains previously identified as *P. intermedia*. This strain together with *P. gingivalis* are commonly isolated from periodontal infections being considered the most abundant putative black pigmented species [2,4,9,11,18]. When considering isolates from patients with periodontal disease, *Prevotella* sp. has been the most prevalent anaerobe isolate [16,25]. The presence of  $\beta$ -lactamases resistance genes in these strains is probably correlated with the fact that the  $\beta$ -lactams antibiotics are used as the first-line treatment in oral medicine.

As expected, oral bacterial species also carry in addition other resistance genes, such as tetracycline and erythromycin antibiotic resistance genes, probably due to the diversity of mechanisms of transfer of genetic material.

These results support the idea that the prescription of an antibiotic in oral medicine must be a carefully act based in clinical data, and not an empirical attitude, particularly in oral infections such as periodontitis.

## Funding

This work was supported by national funds through FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P. in the project UID/Multi/04546/2019.

Freitas D (2019) Prevalence of antibiotic (β-lactams, tetracycline, metronidazole, erythromycin) resistance genes in periodontic infections

### Conflicts of interest

The authors have stated explicitly that there are no conflicts of interest in connection with this article.

### Acknowledgement

All authors have read and approved the final article.

### References

- Dupin C, Tamanai-Shacoori Z, Ehmann E, Dupont A, Barloy-Hubler F, et al. (2015) Oral Gram-negative anaerobic bacilli as a reservoir of β-lactam resistance genes facilitating infections with multiresistant bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 45: 99-105. [Crossref]
- Andrés MT, Chung WO, Roberts MC, Fierro JF (1998) Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* spp. isolated in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 3022-3023.
- Gatignol JP, Poulet PP, Desse T, Duffaut D (2003) Comparison of laboratory methods for detecting β-lactamase positive strains in the species *Prevotella intermedia sensu lato* isolated from periodontal pockets. *Eur J Clin Microbiol Infectious Dis* 22: 389-391.
- Fosse T, Madmier I, Hitzig C, Charbit Y (1999) Prevalence of β-lactamase-producing strains among 149 anaerobic Gram-negative rods isolated from periodontal pockets. *Oral Microbiol Immunol* 14: 352-357.
- Iwahara K, Kuriyama T, Shimura S, Williams DW, Yanagisawa M, et al. (2006) Detection of *cxkA* and *cxkA2*, the β-lactamase genes of *Prevotella* spp. in clinical samples from dentoalveolar infection by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 44:172-176.
- Salinas MB, Riu NC, Aytés LB, Escoda CG (2006) Antibiotic susceptibility of the bacteria causing odontogenic infections. *Med Oral, Patol Oral Ciruj Bucal* 11: E70-E75.
- Van Winkelhoff AJ, Winkel EG (2005) Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontol* 2000 39: 40-52.
- Herrera D, van Winkelhoff AJ, Dellempijn-Kippuv N, Winkel EG, Sanz M (2000) β-lactamase producing bacteria in the subgingival microflora of adult patients with periodontitis. A comparison between Spain and The Netherlands. *J Clin Periodontol* 27: 520-525.
- Handal T, Olsen I, Walker CB, Caugant DA (2005) Detection and characterization of beta-lactamase genes in subgingival bacteria from patients with refractory periodontitis. *FEMS Microbiol Lett* 242: 319-324.
- Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, et al. (2006) Incidence and antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas gingivalis* isolated from mixed endodontic infections. *Int Endod J* 39: 62-70.
- Pina P, Cunha S, Silva R, Sousa JC, Lopes Cardoso I (2011) Antimicrobial susceptibilities of *Porphyromonas* and *Prevotella* species isolated from periodontitis infections in the north of Portugal. In: IV International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (BIOMICROWORLD2011). Málaga, Spain. Microbes in Applied Research: Current Advances and Challenges. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, pp. 492-494.
- Koukos G, Papadopoulos C, Tsalikis L, Sakellari L, Arsenakis M, et al. (2015) Prevalence of antibiotic resistance genes in subjects with successful and failing dental implants. A pilot study. *Open Dent J* 8: 257-263.
- Najafi Moseleh M, Gharibi M, Alikhani MY, Saidijam M, Vakhshiteh F (2014) Antimicrobial susceptibility and analysis of macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* isolated in Hamadan. *Iran J Basic Med Sci* 17: 595-599.
- Ubukata K, Iwata S, Sunakawa K (2003) In vitro activity of new ketolide, telithromycin, and eight other macrolide antibiotics against *Streptococcus pneumoniae* having *mefA* and *ermB* genes that mediate macrolide resistance. *J Infect Chemother* 9: 221-226.
- Handal T, Caugant DA, Olsen I (2003) Antibiotic resistance in bacteria isolated from subgingival plaque in the Norwegian population with refractory marginal periodontitis. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 1443-1446.
- Maestre JR, Bascones A, Sánchez P, Matesanz P, Aguilar L, et al. (2007) Odontogenic bacteria in periodontal disease and resistance patterns to common antibiotics used as treatment and prophylaxis in odontology in Spain. *Rev Esp Quimioter* 20: 61-67.
- Dubreuil L, Behra-Mielliet J, Vouillot C, Bland S, Sedilian A, et al. (2003) β-lactamase production in *Prevotella* and in vitro susceptibilities to selected β-lactam antibiotics. *Int J Antimicrob Agents* 21: 267-273.
- Collins JR, Arredondo A, Roa A, Valdez Y, León R, et al. (2016) Periodontal pathogens and tetracycline resistance genes in subgingival biofilm of periodontally healthy and diseased Dominican adults. *Clin Oral Investig* 20: 349-356.
- Mattö J, Asikainen S, Vaisanen ML, von Troil-Lindén B, Könönen E, et al. (1999) β-lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2383-2388.
- Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Mattos VS, Grecca FS, et al. (2014) Beta-lactamase resistance profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* species isolated from acute endodontic infections. *J Endod* 40: 339-344.
- Binta B, Patel M (2016) Detection of *cxkA2*, *cxkA3*, and *cxkA6* genes in beta-lactamase producing oral anaerobes. *J Appl Oral Sci* 24: 142-147. [Crossref]
- Ioannidis I, Sakellari D, Spala A, Arsenakis M, Konstantinidis A (2009) Prevalence of *tetM*, *tetQ*, *num* and *bla(TEM)* genes in the oral cavities of Greek subjects: a pilot study. *J Clin Periodontol* 36: 569-574. [Crossref]
- Koukos G, Konstantinidis A, Tsalikis L, Arsenakis M, Slini T, et al. (2016) Prevalence of β-lactam (*bla TEM*) and Metronidazole (*num*) Resistance Genes in the Oral Cavity of Greek Subjects. *Open Dent J* 10: 89-98. [Crossref]
- Ashimoto A, Chen C, Bakker I, Slots J (1996) Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 11: 266-273.
- Xie Y, Chen J, He J, Miao X, Xu M, et al. (2014) Antimicrobial resistance and prevalence of resistance genes of obligate anaerobes isolated from periodontal abscesses. *J Periodontol* 85: 327-334.
- Falagas ME, Siakavellas E (2000) Bacteroides, *Prevotella* and *Porphyromonas* species: a review of antibiotic resistance and therapeutic options. *Int J Antimicrob Agents* 15: 1-9.

Copyright: ©2019 Freitas D. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.