



LETÍCIA MARIA MENEZES NOBREGA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE CANAIS
RADICULARES INFECTADOS EM CASOS DE ABSCESSO APICAL
AGUDO POR CULTURA, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO
GENE 16S rRNA**

Piracicaba

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LETÍCIA MARIA MENEZES NOBREGA

**ESTUDO DA DIVERSIDADE BACTERIANA DE CANAIS
RADICULARES INFECTADOS EM CASOS DE ABSCESSO APICAL
AGUDO POR CULTURA, CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO
GENE 16S rRNA**

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

TESE APRESENTADA À FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM
CLÍNICA ODONTOLÓGICA NA ÁREA DE
ENDODONTIA.

Este exemplar corresponde à versão final da
Tese defendida pelo aluno, e orientada pelo
Prof^ª Dr^ª Brenda P. F. A. Gomes

Assinatura da Orientadora

Piracicaba, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

N669e Nobrega, Letícia Maria Menezes, 1983-
Estudo da diversidade bacteriana de canais radiculares infectados em casos de abscesso apical agudo por cultura, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA / Letícia Maria Menezes Nobrega. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia . 2. Abscesso Periapical. 3. Microbiologia. 4. Bactéria. 5. Biologia molecular. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida, 1961- II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Study of bacterial diversity of infected root canal with acute apical abscess by culture, cloning and 16S rRNA sequencing

Palavras-chave em Inglês:

Endodontics
Periapical abscess
Microbiology
Bacteria
Molecular Biology

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]
Fábio Roberto Dametto
Rejane Andrade de Carvalho
Rogério de Castilho Jacinto
Caio César Randi Ferraz

Data da defesa: 23-11-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 23 de Novembro de 2012, considerou a candidata LETÍCIA MARIA MENEZES NÓBREGA aprovada.

Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Prof. Dr. FÁBIO ROBERTO DAMETTO

Profa. Dra. REJANE ANDRADE DE CARVALHO

Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

Prof. Dr. ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO

*Se eu pudesse deixar um presente à você,
deixaria aceso o sentimento de amar.
A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora.
Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem.
Deixaria para você, se pudesse, o respeito aquilo que é indispensável.
Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação.
E, quando tudo mais faltasse, um segredo:
Buscar no interior de si mesmo a resposta
e a força para encontrar a saída.
Mahatma Gandhi*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

“A gratidão é uma maneira de expressarmos um sentimento por algo que recebemos, e não temos condição nenhuma, ou meios, para dar em troca”

(Autor desconhecido)

Agradeço à **Deus e Nossa Senhora**, pelas bênçãos e graças durante minha caminhada. Por me carregarem no colo nos momentos difíceis e por me fazerem compreender que tudo tem o seu tempo. Obrigada pelo dom da vida, pelo sustento, amparo e sabedoria. Obrigada pelos anjos colocados em minha vida e porque este é o tempo de colher os frutos desta jornada.

Aos meus pais **José e Maria de Lourdes**, que são a minha vida, Agradeço pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo. Obrigada por todas as oportunidades, por não medirem esforços para que eu pudesse chegar até aqui, vibrando com cada vitória e apoiando-me incondicionalmente nas dificuldades.
Amo muito vocês!

Ao meu marido **Rodrigo** que eu tanto amo.
Agradeço pela paciência, amor e compreensão nos momentos de ausência.
Obrigada pelo incentivo, por me encorajar sempre,
e por me fazer mais feliz a cada dia!

À **Larissa e Túlio**, meus irmãos queridos, que sempre me apoiaram.
Obrigada pelo carinho e amizade. Sou privilegiada por tê-los em minha vida!
Aos amados sobrinhos **José Henrique, Daniel** e a pequena **Lara Maria**,
que só trazem alegria para minha vida.

...Meus sinceros agradecimentos!

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora, **Profa. Dra. Brenda Gomes**, pela acolhida e confiança em mim depositada desde o primeiro momento em que cheguei na FOP-Unicamp. Agradeço pelos ensinamentos transmitidos, por toda a disponibilidade e pelas maravilhosas oportunidades que me deu. Obrigada pelos conselhos, pelo apoio, por me fazer acreditar que eu seria capaz. Os bons momentos que compartilhamos juntas serão sempre lembrados com muita alegria e carinho, os difíceis trouxeram amadurecimento... Mas tenha certeza que todos foram para mim grandes oportunidades de aprendizado, crescimento pessoal e profissional. Obrigada por tudo!

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior** e do diretor associado **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**.

À **Profª. Drª. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, coordenadora geral dos cursos de Pós-Graduação e ao **Prof. Dr. Márcio de Moraes**, coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica.

Aos professores da Endodontia, **Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho**, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **Profa. Dra. Brenda Paula Fiquieredo de Almeida Gomes**, **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz** e **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**, indispensáveis na minha formação como Endodontista. Muito obrigada pelos ensinamentos, conhecimentos transmitidos, experiências compartilhadas e por me mostrarem a beleza, ciência e arte da Endodontia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (**FAPESP**) pela concessão da bolsa de estudo para o doutorado, processo nº 2009/07760-5.

À **Profa Márcia Mayer, Adriana Ribeiro, Pâmela Ponte** e demais alunos do Laboratório de Microbiologia Oral da USP – São Paulo, onde desenvolvi parte dos experimentos da minha tese, por terem me acolhido com tanto carinho e atenção. Obrigada pelos ensinamentos, pelo auxílio sempre que precisei e disponibilidade sempre que solicitadas. Meu estágio com vocês foi maravilhoso! Só tenho a agradecer pela oportunidade que me deram de termos trabalhado juntas e conhecer pessoas tão especiais.

Aos queridos professores **Dr. Cícero Romão Gadê Neto, Dra. Rejane Andrade de Carvalho e Dr. Fábio Dametto**, grandes mestres que despertaram meu interesse pela Endodontia, muito me ensinaram e sempre me incentivaram para que pudesse chegar até aqui. Obrigada pelas orientações desde minha graduação, ensinamentos que carrego comigo sempre, não só pela forma especial de orientar, ética e brilhantismo profissional, mas também pelo humanismo e amizade. Agradeço o apoio e amizade.

Aos funcionários da Endodontia, **Ana Cristina Godoy, Geovania Almeida, Daiane Scutton, Wanderly Almeida, Ana Elídia e Ana Paula** por serem sempre solícitas e dispostas a ajudar. Obrigada pela atenção.

Aos amigos e companheiros de trabalho da clínica **Perfecta Odontologia Estética**, pela oportunidade e compreensão nos momentos de ausência.

Aos meus familiares, que sempre torceram por mim, aos amigos e todas as pessoas que participaram de forma direta e indireta, contribuindo para a realização desse trabalho.

Às amigas **Luana e Brunna** pela amizade, agradável convivência e companhia durante esta etapa.

Aos colegas do laboratório, mestrandos e doutorandos, **Ana Carolina Pimentel, Ana Mascarenhas, Ana Carolina Caiado, Aniele Lacerda, Ariane Marinho, Carlos Augusto Pantoja, Carlos Vieira Andrade Júnior, Carolina Santos, Cláudia Suzuki, Cimara Brum, Érika Clavijo, Daniel Herrera, Daniela Miyagaki, Danna Mota Moreira, Douglas Decchin, Emanuel João da Silva, Fernanda Freitas Lins, Fernanda Signoretti, Francisco Montagner, Frederico Martinho, Giselle Abi Rached, Jefferson Marion, Juliana Melo da Silva, Juliana Nagata, Karine Schell, Maira do Prado, Marcos Endo e Maria Raquel Monteiro, Shaiana Kawagoe e Thais Accorsi, Thais Mageste Duque, Thiago Farias e Tiago Rosa**, pelo companheirismo, amizade, troca de experiências, aprendizado e alegre convívio durante todo este tempo. Foi muito bom conhecer cada um de vocês!

*“Foi-se o tempo apressado... e se sentir saudade, não se preocupe,
pois saudade é o rastro que a felicidade deixou!” (Ritzman)*

Andei...

Por caminhos difíceis eu sei.

Mas olhando o chão sob meus pés deixo a vida correr.

E assim, cada passo que der, tentarei fazer o melhor que puder.

Aprendi...

Não tanto quanto quis, mas vi que conhecendo

O universo ao meu redor, aprendo a me conhecer melhor,

E assim escutarei o tempo, que ensinará a tomar a decisão certa em cada momento.

E partirei, em busca de muitos ideais...

Mas sei que hoje se encontram o meu passado, presente e futuro.

Hoje sinto em mim a emoção da despedida.

Hoje é um ponto de chegada, e ao mesmo tempo, um ponto de partida.

Fernando Sabino

RESUMO

Abscessos apicais agudos são condições frequentes na urgência endodôntica. São infecções polimicrobianas que apresentam variações entre indivíduos, e afetam o sistema de canais radiculares e tecidos periapicais. Associações bacterianas podem ser importantes, agindo sinergicamente e aumentando sua virulência, o que agrava os danos causados no hospedeiro. Considerando a etiologia microbiana das alterações pulpares e periapicais, é de fundamental importância identificar corretamente as bactérias presentes nas infecções endodônticas. Métodos moleculares de identificação bacteriana, baseados no sequenciamento do gene 16S rRNA, são importantes e fornecem uma identificação mais fiel que métodos fenotípicos. Estudos metagenômicos são ideais para avaliação da diversidade bacteriana, possibilitando identificação de espécies que se acreditava não estarem sendo cultivadas, ou encontrar espécies que ainda não foram encontradas ou associadas com infecções endodônticas, incluindo espécies ainda não cultiváveis. O objetivo deste estudo foi investigar a diversidade bacteriana de canais radiculares de dentes com abscesso apical agudo por cultura, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA, comparando a efetividade dos métodos. Foram feitas coletas microbiológicas de 20 canais radiculares utilizando cones de papel absorvente estéreis, transportados em meio VMGA III. Um total de 220 cepas isoladas, identificadas previamente por métodos bioquímicos, foram submetidas à extração de DNA, amplificação do gene 16S rRNA seguido de sequenciamento. Além disso, 10 das 20 amostras coletadas foram também submetidas à clonagem bacteriana através de *Escherichia coli* DH5 α eletrocompetentes. As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com o banco de dados do National Center of Biotechnology Information através do BLAST. Trinta e quatro espécies diferentes foram identificadas bioquimicamente e 57 pelo sequenciamento, numa média de 6 espécies por canal. O sequenciamento permitiu identificação de 97% das bactérias isoladas (215), enquanto apenas 70,5% foram identificadas

bioquimicamente (155). A concordância entre os métodos de identificação fenotípica e genotípica foi de 49% e as cepas não identificadas bioquimicamente (65/220) foram caracterizadas em 97% (63/65) pelo sequenciamento. As bactérias mais frequentemente identificadas pelo sequenciamento foram *Prevotella* spp., *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Parvimonas micra*, *Dialister invisus*, *Filifactor alocis* e *Peptostreptococcus stomatis*. Um total de 689 clones foi analisado e 76 filotipos foram identificados, numa média de 15 por canal. Quarenta e oito espécies diferentes foram identificadas e 28 (36,84%) filotipos representados por espécies ainda não cultivadas ou não caracterizadas. *Prevotella* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis* e *Peptostreptococcus stomatis*, foram as espécies mais frequentemente identificadas, seguidas por *Dialister invisus*, *Parvimonas micra*, *Phocaeicola abscessus*, *Porphyromonas* spp. e *Lachnospiraceae oral clone*.. Nenhuma espécie foi encontrada em todos os casos estudados, e algumas estavam presentes em apenas 1 caso. Métodos que independem da cultura mostram que a microbiota endodôntica pode ser subestimada por estudos cultura-dependentes. Apesar de algumas espécies serem predominantes em infecções endodônticas primárias, como as anaeróbias Gram-negativas, concluímos que esta infecção é bastante complexa e heterogênea, caracterizada por uma grande diversidade bacteriana. A associação de métodos convencionais e moleculares permite um conhecimento mais acurado da microbiota endodôntica.

Palavras-Chaves: Infecção endodôntica, Abscesso Apical Agudo, Microbiologia endodôntica, Diversidade bacteriana, Cultura, Clonagem, Sequenciamento do gene 16S rRNA

ABSTRACT

Acute apical abscesses are one of the most frequently treated conditions in endodontic emergency. It is a microbiologically heterogeneous disease presenting different bacterial profiles among the patients. Multiple bacterial combinations play a role in disease, acting synergistically and increasing their virulence, which leads to further damage to the host. Considering the microbial etiology of pulp and periapical disease, it is important to identify correctly microorganisms present in acute endodontic infection. Molecular methods of bacterial identification based on the 16S rRNA gene sequencing represent an important tool for identification and determination of the taxonomic position of microorganisms. The assessment of the endodontic microbiota by metagenomic approaches revealed that these techniques are sensitive and specific to evaluate the bacterial diversity of root canal infections, making possible the identification of some unexpected or not often associated with endodontic infection, including as-yet-uncultivated. The aim of this study was to investigate the bacterial diversity in the root canals of teeth with APA by culture, clonal analysis and 16S rRNA sequencing. Microbial samples were taken from 20 root canals using sterile paper points which were immediately placed into the VMGA III transport medium. A total of 220 isolated strains, previously identified by biochemical methods, were submitted to DNA extraction, 16S rRNA gene amplification and sequencing. Ten out of the 20 samples collected were also subjected to the clonal analysis using electrocompetent *Escherichia coli* DH5 α . The nucleotides sequences obtained were compared with the GenBank database from National Center of Biotechnology Information through the BLAST. Thirty-four different bacteria were identified biochemically and 57 by 16S rRNA sequencing, in an average of 6 species per root canal. Sequencing allowed the identification of 97% of isolates against 70.5% identified biochemically. There was an agreement of 49% between the biochemical and 16S rRNA gene sequencing identification. Strains not identified biochemically (65/220) were characterized in 97% (63/65) by sequencing. The most frequently identified bacteria by sequencing were *Prevotella*

spp., *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Parvimonas micra*, *Dialister invisus*, *Filifactor alocis* and *Peptostreptococcus stomatis*. A total of 689 clones were analyzed and 76 phylotypes identified, of which 48 (63.15%) were different species and 28 (36.84%) were taxa reported as-yet-uncultivable or as yet-uncharacterized species. *Prevotella* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis* and *Peptostreptococcus stomatis*, were the most frequently detected species, followed by *Dialister invisus*, *Parvimonas micra*, *Phocaeicola abscessus*, *Porphyromonas* spp. and the uncharacterized *Lachnospiraceae oral clone*. No specie was detected in all studied samples and some species were identified in only one case. Culture-independent methods shown that endodontic microbiota was underestimated in culture studies. Although some species predominate in acute primary endodontic infections, it was concluded that this infection is microbiologically heterogeneous, characterized by a wide diversity in which anaerobic gram-negatives are most frequently, and that the association of conventional and molecular approaches allow a better understanding of these microorganisms.

Key-words: Endodontic Infection, Acute Apical Abscess, Endodontic Microbiology, Bacterial Diversity, Culture, Clonal analysis, 16S rRNA gene Sequencing

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - CAPÍTULO 1: Molecular identification of cultivable bacteria from infected root canal with acute apical abscesses.	9
3 - CAPÍTULO 2: Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis.	25
4 - CAPÍTULO 3: Comparison between biochemical and molecular identification of bacteria isolated by culture from root canal with acute apical abscess	45
5 - CONSIDERAÇÕES GERAIS	61
6 - CONCLUSÃO	69
7 - REFERÊNCIAS	71
APÊNDICE	79
1- DETALHAMENTO DA METODOLOGIA	79
2- DETALHAMENTO DOS RESULTADOS	93
ANEXOS: Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	121

1- INTRODUÇÃO

As principais alterações patológicas que acometem a polpa e os tecidos perirradiculares são de natureza inflamatória e de etiologia microbiana (Takehashi *et al.*, 1965). Os microrganismos e seus produtos metabólicos são os maiores responsáveis pela instalação, desenvolvimento e manutenção das patologias pulpo-periapicais, bem como sinais e sintomas de origem endodôntica (Sakamoto *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2004; 2008; Siqueira & Roças, 2009a; Li *et al.*, 2010).

Os abscessos apicais agudos (AAA) resultam da extensão da infecção presente inicialmente no interior do sistema de canais radiculares à área perirradicular (Brook *et al.*, 1981). O estabelecimento de um abscesso periapical agudo está condicionado à presença de uma infecção altamente virulenta no interior dos canais radiculares, que superou o sistema de defesas do organismo (Torabinejad *et al.*, 1994). Se não tratada, a infecção vai progredir e pode causar maiores danos tissiduais e acúmulo de pús, resultando em dor intensa e edema, além da possibilidade de evoluir para uma infecção orofacial (Siqueira e Roças 2009b; Montagner *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

A microbiota das infecções de canais radiculares com necrose pulpar e abscessos periapicais agudos tem sido tradicionalmente estudada através dos métodos de cultura microbiana e recentemente complementada por métodos moleculares (Munson *et al.*, 2002; Rôças *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2007; Riggio *et al.*, 2007; Montagner, 2009, 2010; Montagner *et al.*, 2010a, 2010b, 2012). Diversas espécies microbianas cultiváveis, de difícil cultivo e ainda não cultivadas, além de clones orais e microrganismos pertencentes ao domínio *Archaea* são associados a tais infecções, constituindo comunidades únicas e complexas (Sakamoto *et al.*, 2006; Vianna *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2007; Saito *et al.*, 2006, Montagner, 2009, 2010; Montagner *et al.* 2012a,b).

Os microrganismos anaeróbios estritos *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium necrophorum*, *Peptococcus prevotii*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Gemella morbillorum*, *Tannerella forsythia*, *Phocaeicola abscessus*, *Shuttleworthia satellites*, *Treponema* spp., *Dialister* spp. e *Veillonella* spp., e os facultativos *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus mitis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* e *Eubacterium lentum* são as espécies mais freqüentemente isoladas em canais radiculares de dentes com sintomatologia dolorosa espontânea de origem endodôntica (Sundqvist *et al.*, 1989; Downes *et al.*, 2002; Villanueva, 2002; Jacinto *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2003; Montagner, 2009, 2010; Montagner *et al.*, 2010a, 2010b, 2012).

A árvore filogenética da vida, baseada na comparação de sequências de RNA ribossomal, estrutura da parede celular e metabolismo, classifica os seres vivos em 3 domínios: *Eukaria* (animais, vegetais e fungos), *Bacteria* e *Archaea* (ambos representados por organismos procariontes, diferindo entre eles na estrutura da parede celular e metabolismo). A cavidade oral é um ambiente colonizado por uma grande diversidade de microrganismos, onde representantes desses 3 domínios já foram detectados e cerca de 700 espécies bacterianas já foram identificadas. Entretanto o ambiente seletivo do canal radicular faz com que apenas alguns microrganismos sejam capazes de colonizar este sistema (Gomes *et al.*, 1994; Munson *et al.*, 2002; Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Siqueira & Roças 2005; Ribeiro *et al.*, 2011; Ozok *et al.*, 2012). Apesar de haver um predomínio de bactérias, protozoários, fungos, leveduras, destacando-se *Candida albicans* (Baumgartner *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003), vírus incluindo herpes vírus, citomegalovírus, papiloma vírus (Sabeti *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Sabeti *et al.*, 2012) e *Archaea* (Siqueira & Roças, 2005; Vianna *et al.*, 2006; Siqueira & Roças, 2009a) também já foram identificados em infecções endodônticas.

Archaea compreende alguns microrganismos capazes de sobreviver em condições extremas (vulcões, regiões extremamente salinas, fontes água quente) e metabolizar H₂ e CO₂, produzindo em gás metano. Estudos recentes

identificaram componentes deste domínio em infecções endodônticas, e sugerem a importância desses microrganismos metanogênicos para o ecossistema bacteriano das infecções endodônticas (Vianna *et al.*, 2006; Vickerman *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2009).

Estudos através dos métodos de cultura envolvem o cultivo de amostras coletadas do canal radicular em meios contendo nutrientes adequados, isolamento das colônias, crescimento em condições gasosas de acordo com o requerimento dos diferentes microrganismos e identificação através de testes bioquímicos (métodos fenotípicos). Avanços nas técnicas de cultura têm permitido uma descrição mais detalhada da composição das infecções endodônticas (Jacinto *et al.*, 2003, Gomes *et al.*, 2004), porém, a identificação por métodos bioquímicos pode não abranger todos os microrganismos que estão envolvidos na infecção por limitações do seu banco de dados. Outra dificuldade da identificação fenotípica é o possível comportamento atípico das cepas, onde cepas de uma mesma espécie, que são geneticamente similares, podem ter evoluído para serem fenotipicamente diferentes, ou então, cepas de espécies diferentes, que são geneticamente diferentes, podem ter evoluído para terem um comportamento fenotípico semelhante, o que leva a falhas na interpretação dos testes de diagnóstico bioquímicos (Siqueira *et al.*, 2005; Vianna *et al.*, 2005). Além disso, a interpretação de testes fenotípicos pode envolver o julgamento subjetivo da pessoa que o está realizando (Drancourt *et al.*, 2000). Assim sendo, em algumas circunstâncias, mesmo uma cultura bem sucedida de um dado microrganismo, não significa necessariamente que este microrganismo possa ser identificado com sucesso (Weile & Knabbe, 2009).

As vantagens dos métodos de cultura estão relacionadas ao seu espectro relativamente amplo, o que torna possível identificar uma grande variedade de microrganismos numa mesma amostra, incluindo aqueles que não se esperava encontrar. A cultura torna possível determinar a viabilidade, suscetibilidade antimicrobiana destes isolados e estudar sua fisiologia e sua

patogenicidade (Shah & Gharbia, 1993; Dahlén, 2002; Vianna *et al.*, 2005; 2008; Weile & Knabbe, 2009; Schirrmeister *et al.*, 2009).

As infecções endodônticas primárias (infecções iniciais) são polimicrobianas, onde predominam bactérias gram-negativas anaeróbias estritas, porém as facultativas e gram-positivas também exercem papel importante na infecção, agindo sinergicamente e tornando ainda mais complexa a antigenicidade dessa infecção para o sistema imune do hospedeiro (Gomes *et al.*, 1994, Siqueira *et al.*, 2001a; 2001b; Gomes *et al.*, 2004; Siqueira & Roças, 2006; Jacinto *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2008; Martinho *et al.*, 2011).

Algumas espécies bacterianas tais como *Porphyromonas* spp, *Prevotella* spp, *Fusobacterium* spp e *Peptostreptococcus* spp estão relacionadas com sintomas clínicos e exercem um papel significativo na patogênese das lesões inflamatórias periapicais (Baumgartner *et al.*, 1999; Siqueira *et al.*, 2001b; Fouad *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2008; Vickerman *et al.*, 2007; Montagner *et al.*, 2012). No entanto acredita-se que parte da microbiota endodôntica ainda não tenha sido identificada, pois metodologias utilizando técnicas de cultura apresentam limitações que podem subestimar a diversidade desta microbiota (Paster *et al.*, 2001; Munson *et al.*, 2002; Siqueira & Roças, 2004; Vianna *et al.*, 2005).

Além das espécies já comumente identificadas em infecções endodônticas primárias sintomáticas (casos de abscesso periapical agudo) através de métodos cultura-dependentes (*Porphyromonas* spp, *Prevotella* spp, *Fusobacterium* spp e *Peptostreptococcus* spp), outras espécies como *Tannerella forsythia*, *Filifactor alocis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Treponema* spp, *Dialister* spp, *Olsenella* spp e *Veillonella* spp passaram a ser frequentemente identificadas por métodos moleculares (Rolph *et al.*, 2001; Sakamoto *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2006a; Jacinto *et al.*, 2007; Sassone *et al.*, 2009; Siqueira & Roças, 2009a; 2009b; Yang *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011; Montagner *et al.*, 2012).

O conhecimento da natureza da microbiota endodôntica depende da eficiência dos métodos de identificação existentes, que incluem técnicas tradicionais

como a cultura e técnicas moleculares. A identificação acurada de um isolado microbiano é muito importante na microbiologia clínica (Drancourt *et al.*, 2000). Algumas bactérias são difíceis de cultivar, pois são bastante exigentes em relação aos requerimentos gasosos/nutricionais, e isso pode representar uma barreira para o melhor entendimento da infecção (Pinheiro *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2006; Siqueira *et al.*, 2007).

Para que uma bactéria possa ser identificada pelo seu DNA ela tem que um dia ter sido cultivada para que se conheça o seu código genético. Desta forma, é justo acreditar que a cultura é bastante importante, apesar de suas limitações e dos avanços dos métodos moleculares (Gomes & Montagner, 2010).

Técnicas moleculares de clonagem e sequenciamento revelaram a presença de microrganismos pertencentes a 13 filos na cavidade oral (Dewhirst *et al.*, 2010). Em canais radiculares infectados já foi relatada a presença de 10 filos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria*, *Synergistetes*, *Spirochaetes*, *Deinococcus-Thermus*, *TM7* e *SR1* (Munson *et al.*, 2002; Siqueira & Roças 2005; Jacinto *et al.*, 2007; Siqueira e Roças, 2009a; Li *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011).

A aplicação de metodologias da biologia molecular para diagnóstico e identificação de microrganismos possibilitou expandir o conhecimento sobre a microbiota oral e endodôntica (Siqueira *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2004; Siqueira & Roças, 2004; Munson *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2006; Siqueira & Roças, 2009a; Ribeiro *et al.*, 2011). Dentre as técnicas moleculares podemos destacar a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e suas diversas variações (Nested-PCR, Multiplex PCR, Real-Time Quantitative PCR), Hibridização DNA-DNA (Checkerboard), Eletroforese em Gel de Gradiente de Desnaturação (DGGE), Polimorfismo do Comprimento do Fragmento Terminal de Restrição (TRFLP), Clonagem e Sequenciamento. Todas elas são baseadas na identificação bacteriana através do gene 16S rRNA, uma região do DNA bacteriano bastante conservada e sendo assim bem específica para cada espécie. Este gene apresenta regiões conservadas suficientes para alinhamento acurado, e

variações suficientes para análise filogenética (Chan & McLaughlin, 2000; Siqueira *et al.*, 2001a; Clarridge, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2007).

A sensibilidade da cultura é de aproximadamente 10^4 a 10^5 células microbianas para uma determinada espécie usando meios não seletivos, e 10^3 usando meios seletivos, enquanto que para o PCR varia de 10 a 10^2 células, dependendo da técnica usada. Por exemplo, o Nested PCR pode detectar espécies na presença de 10 células. Já o limite de detecção da hibridização DNA-DNA varia de 10^3 a 10^4 células (Siqueira & Roças, 2005; Gomes *et al.*, 2006b).

A grande vantagem desses métodos moleculares, que independem da cultura, é a identificação de bactérias difíceis de cultivar, fastidiosas, algumas incultiváveis até o momento ou cepas com comportamento fenotípico atípico, não podendo ser identificadas fielmente por métodos bioquímicos após a cultura (Jung *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2001b; Vianna *et al.*, 2005; Foshi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006a; Weile & Knabbe, 2009). A clonagem e sequenciamento permitem a identificação dos microrganismos de uma infecção sem procurar por bactérias específicas, mas sim tentando identificar o maior número possível de bactérias presentes na infecção mista. Diferente dos métodos de identificação fenotípica, o sequenciamento do 16S rRNA fornece identificação inquestionável até mesmo para bactérias que são raras. Isto permite identificar numa cultura espécies que por ventura acreditava-se que não estavam sendo cultivadas, e que na verdade apenas não estavam sendo identificadas corretamente, ou até encontrar espécies que ainda não foram cultivadas o que levaria a descrição de novos patógenos endodônticos (Patel, 2001; Ribeiro *et al.*, 2011).

Sabendo o papel dos microrganismos nas doenças pulpo-periapicais, e considerando que o principal objetivo do tratamento endodôntico é combater a infecção, é de fundamental importância conhecer a microbiota endodôntica (Pinheiro *et al.*, 2003; Montagner *et al.*, 2010a), para que possamos adotar corretas estratégias de tratamento, melhorando o prognóstico.

Um aspecto bastante importante no estudo da microbiologia endodôntica é a associação de metodologias, permitindo o conhecimento mais

detalhado dessa microbiota, fornecendo informações relevantes sobre a relação de tais microrganismos com sintomatologias e possíveis interações entre espécies que podem ser significantes na etiopatogenia e manutenção dessas patologias. Além disso, estudos microbiológicos possibilitam investigações a respeito da ação de medicações, substâncias e protocolos de tratamento sobre essa microbiota, suportando cientificamente as decisões clínicas (Gomes *et al.*, 2006b; Vianna *et al.*, 2005, 2008; Gomes *et al.*, 2008; Weile & Kanbbe, 2009; Schirrmeister *et al.*, 2009; Montagner *et al.*, 2012).

Diante disto, o presente estudo visa investigar a diversidade bacteriana de canais radiculares infectados em casos de abscesso apical agudo, através de diferentes metodologias, comparando a efetividade das mesmas.

2 - CAPÍTULO 1

Molecular identification of cultivable bacteria from infected root canal with acute apical abscesses

Nóbrega LMM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MAP, Gomes BPFA

ABSTRACT

Introduction: Microorganisms growing on culture plates may exist in higher number in root canals among those that are cultivable and their number and virulence are directly related to the disease. Acute apical abscesses (APA) are polymicrobial infections that affect both root canal system and apical tissues. Therefore, the aim of this research was to study the bacterial composition found in root canals of teeth associated with AAA by molecular identification of cultivable bacteria. **Methods:** Two hundred twenty strains from 20 cases isolated by culture were submitted to DNA extraction and amplification of the 16S rRNA gene (PCR), followed by sequencing. The resulting nucleotide sequences were compared to the GenBank database from the National Center of Biotechnology Information through BLAST. Samples not identified by sequencing were submitted to clonal analysis. **Results:** The most frequently bacteria identified by 16S rRNA sequencing were *Prevotella* spp., *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Parvimonas micra*, *Dialister invisus*, *Filifactor alocis*, *Peptostreptococcus stomatis*. Fifty-nine different bacteria were identified by 16S rRNA gene sequencing. Molecular approaches allowed identification of 99% of isolates. **Conclusion:** It was concluded that infected root canals with acute apical abscess are microbiologically heterogeneous, composed mainly of anaerobic Gram-negatives, the majority belonging to the phylum *Firmicutes*, followed by *Bacteroidetes*.

Key-words: Endodontics; Acute Apical Abscess; Microorganisms; Culture; 16S rRNA gene Sequencing, Clonal analysis

INTRODUCTION

There is a close relationship between microbiology and endodontics. Bacteria from oral cavity may infect a root canal with necrotic pulp and reach periradicular tissue, resulting in a purulent inflammation and leading to pain, swelling, cellulites, in addition to having the potential to diffuse to other facial spaces of the head and neck (1-4). Because microorganisms are involved in pulp and periapical diseases, and endodontic therapy is essentially a debridement procedure, the knowledge of microbiology is crucial to understand the phases of endodontic debridement and canal obturation (5, 6).

Acute apical abscesses are one the most frequently treated conditions in endodontic emergency procedures. Clinically, they are characterized by spontaneous pain, tenderness/pain to percussion, and pain on palpation. The presence of soft-tissue swelling indicates diffusion through bone and may result in life-threatening conditions if immediate treatment is not provided (7).

Researches indicate that the root canals of teeth with acute primary endodontic infection harbor a mixed and complex microbiota, composed predominantly by anaerobic Gram-negative bacteria. Facultative and Gram-positive bacteria also play an important role in endodontic infection, acting synergistically and making even more complex the antigenicity of this infection to the host's immune system (2, 8-12).

The microbiota of root canal infections with pulp necrosis and acute periapical abscesses have traditionally been studied using methods of microbial culture and recently complemented by molecular approaches (2, 7, 10, 13-16). Several cultivable microbial species or microorganisms of difficult growth, not yet cultivated, oral clones and microorganisms belonging to the *Archaea* domain have been associated with such infections, constituting unique and complex communities (1, 14, 16, 17).

The application of molecular methods for bacterial identification enabled detection of some new species and their correlation with endodontic infections, including *Tannerella forsythia*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Treponema* spp.,

Dialister spp. and *Veillonella* spp *Phocaeicola abscessus*, *Shuttleworthia satelles*, *Catonela morbi*, *Acinetobacter lwofii* (1, 5, 6, 16, 18-21).

Microorganisms growing on culture plates may exist in higher number in root canals among those that are cultivable, and their number and virulence are directly related to the disease. Specific oral bacteria have been related to symptomatic conditions, such as pain and swelling (12). Therefore, the aim of this present research was to study the bacterial composition found in root canals of teeth associated with AAA by molecular identification of cultivable bacteria.

MATERIAL AND METHODS

Samples were collected from 20 patients who attended the Piracicaba Dental School, State University of Campinas (UNICAMP), for endodontic treatment due to spontaneous pain associated with root canal infections. The local Human Volunteers Research and Ethics Committee approved the study, and all patients signed an informed consent form. A total of 220 strains were isolated by culture, processed to biochemical identification, stored at -80°C and available for re-analysis by sequencing.

Patient selection and clinical examination

The selection of patients was determined by their dental records as well as clinical and radiographic examination. Inclusion criteria involved report of pulp necrosis, spontaneous pain, periapical lesion and pain to percussion in the examined tooth. In addition, patients who had not received antibiotic therapy in the last 4 months, excluding pathology associated with periodontal disease, were selected for this study.

Root Canal Sampling Microbiological Culture

Root canal sampling and culturing methods for microbial isolation and identification were performed as described previously by Montagner et al (7) and Gomes et al (2, 22).

Dental caries and existing restorations were removed without exposure of the canals. The tooth was isolated from the oral cavity with a rubber dam. The operative field was disinfected with 30% hydrogen peroxide, followed by 2.5% sodium hypochlorite, which was inactivated with 5% sodium thiosulphate. The root canals were exposed by using sterile burs under manual irrigation with sterile saline solution. Samples were taken from both external tooth surface and operative field after disinfection to guarantee the absence of contaminants. No positive growth should be observed for these two samples. If so, the respective root canal sample was immediately excluded from the study.

If the tooth was multi-rooted, either the largest canal in the root or the one with periradicular radiolucency was sampled to confine the microbial evaluation to a single environmental site. A sterile paper point was introduced into the full length of the root canal as determined in a preoperative radiograph and then kept in place for 60 seconds. In the case of a dry root canal, a second paper point moistened in sterile saline solution was used to ensure adequate sample acquisition. In the case of a wet root canal, as many paper points as needed were used to absorb all the fluid inside the canal. Next, the paper points were immediately transferred to a test tube containing 1 ml of VMGA III.

In the anaerobic chamber, the endodontic samples were serially diluted 10 times in tubes containing Fastidious Anaerobe Broth (FAB, Laboratory M, Bury, UK). A 50- μ l sample of each serial dilution as well as of the undiluted sample were plated onto fastidious anaerobe agar (FAA, Laboratory M) with 5% defibrinated sheep blood and containing 1 ml/l of haemin and 1 ml/l of vitamin K1. Bacterial plates were incubated at 37°C under anaerobic conditions (10% CO₂, 10% H₂, and 80% N₂) for up to 14 days. Samples were also plated onto brain heart infusion (BHI) agar with 5% sheep blood (Oxoid, Basingstoke, UK) to allow growth of aerobic and facultative anaerobic microorganisms. The BHI plates were aerobically incubated at 37°C for 2 days.

From each bacterial plate, representative colonies of each morphologic type were cultured in another plate. The purity of isolates was determined by

macroscopic examination of colonies and microscopic examination of bacteria after Gram-staining. Each isolated strain were then stored at -80°C.

16S rRNA Sequencing

The DNA of each previously isolated bacteria was extracted by using QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After extraction, the universal amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed in a total volume of 50uL containing: 5μL of template DNA, 5μL of 10X PCR buffer, 1.5μL of 25 mmol/L MgCl₂, 4.0μL of DNTP solutions (25 mmol/L each), 1μL of 25 pmol forward and universal primer (D88 - 5' GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG 3') and reverse universal primer (E94 - 5' GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA 3'), 0.5μL of 5U/mL Platinum Taq Polymerase and 32 μL of sterile distilled water (23). The reagents were synthesized and provided by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Genomic DNA of *P. gingivalis* (ATCC 33277) and sterile distilled water were used as positive and negative controls, respectively. The reaction was performed in a DNA thermocycler (GenePro, Bioer-Technology, Hangzhou, China) adjusted to initial denaturation step at 94°C for 4 minutes followed by 30 cycles at 94°C for 45 seconds (denaturation), 60°C for 45 seconds (annealing), 72°C for 90 seconds (extension), and a final extension step at 72°C for 15 minutes.

Two independent PCRs were performed for each sample and the PCR products were submitted to electrophoresis in 1% agarose gel stained with 0.5uL/ml ethidium bromide using 1kb DNA ladder as molecular size marker. Positive reactions were determined by the presence of bands of appropriate size (1500 base pair) and then the PCR products were purified by using QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hiden, Germany).

Purified PCR products were sequenced by using the ABI 3730 DNA Analyzer, with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California, EUA) using primer 533R (5' TKACCGCGGCTGCTG 3'). Sequences of approximately 600 bases were obtained, inspected and edited using the software

BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), and the identity/approximate phylogenetic position was obtained by comparison with 16S rRNA gene sequences of the GenBank database from National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) through the basic local alignment search tool (BLAST). Sequences with more than 4 ambiguous characters or shorter than 500 bases were discarded, and it was considered at least 98% similarity level (21).

Clonal Analysis

Five samples isolated by culture were not identified by sequencing because the sequences obtained were inadequate. They presented many ambiguous characters or a sequence length too short for comparison with those in the GenBank.

After DNA extraction from these samples, the universal amplification of 16S rRNA gene and purification was performed following the protocol described above. The purified 16S rRNA gene products were ligated into the pCR2.1-TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit - Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and inserted into electrocompetent DH5 α *Escherichia coli* by means of electroporation (MicroPulser, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). The transformed cells were plated onto Luria-Bertani agar plates supplemented with ampicillin (100mg/ml) and X-Gal (Promega), and then incubated overnight. Ninety-six white colonies *per* sample were randomly selected, suspended in 40 μ L of 10 mmol/L Tris-EDTA, and used as template (5 μ L) to determine the correct sizes of the inserts by PCR. Amplification reaction was performed with M13 forward (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') and M13 reverse (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') primers. The cycling conditions comprised an initial denaturation at 94°C for 10 minutes and included 30 cycles at 94°C for 45 seconds (denaturation), 60°C for 45 seconds (annealing), and 72°C for 90 seconds (extension), followed by a final extension at 72°C for 10 minutes. The PCR products (approximately 1,500 bp) were submitted to electrophoresis in 1% agarose gel and purified with GTX PCR

DNA Purification kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) before sequencing, which was performed following the protocol described above.

Statistical Analysis

The data collected for each case were typed onto a spreadsheet and statistically analysed using SPSS for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA). The Pearson chi-square or the one-sided Fisher's Exact test, as appropriate, was chosen to test the null hypothesis that there was no relationship between any pair of bacterial species recovered from the root canal. The ODDS ratio was employed to classify the associations between bacterial species as positive or negative. Positive associations were those with an average ODDS ratio (OR) > 2.0 and negative with an average ODDS of a ratio < 0.5. A 95% Confidence interval (CI) was established. The significant level was set at 5%.

RESULTS

All 20 patients presented with spontaneous pain, periapical lesion and pain to percussion. Twelve teeth were single-rooted and 8 multi-rooted. Eight teeth were restored, 8 presented with caries and 4 were sound teeth.

From a total of 220 strains isolated by culture 215 were identified by 16s rRNA sequencing. Five strains were not identified by sequencing because the sequences obtained were inadequate. They presented many ambiguous characters or a sequence length too short for comparison with those in the GenBank. The DNA extracted from these strains were submitted to clonal analysis and 3 out of 5 cloned samples were identified. Two strains remained unidentified by means the methodology applied. In the first sample, *Pseudoramibacter alactolyticus* and *Bacillus licheniformis* were detected by cloning, whereas *Pyramidobacter piscolens*, *Campylobacter rectus*, *Phocaeicola abscessus* and *Parvimonas micra* were found in the second sample, and *Vellonella* sp. in the third. This results show that in 2 samples, there were not a pure culture, impeding

the identification through the sequencing methods used here. The fourth and fifth remained unidentified, probably due to DNA degradation.

Molecular methods allowed the identification of 99% of the isolates. A total of 59 different bacteria were identified, including 26 anaerobic Gram-negatives, 18 anaerobic Gram-positives, 12 facultative Gram-positives, and 3 facultative Gram-negative species (**Figure 1**).

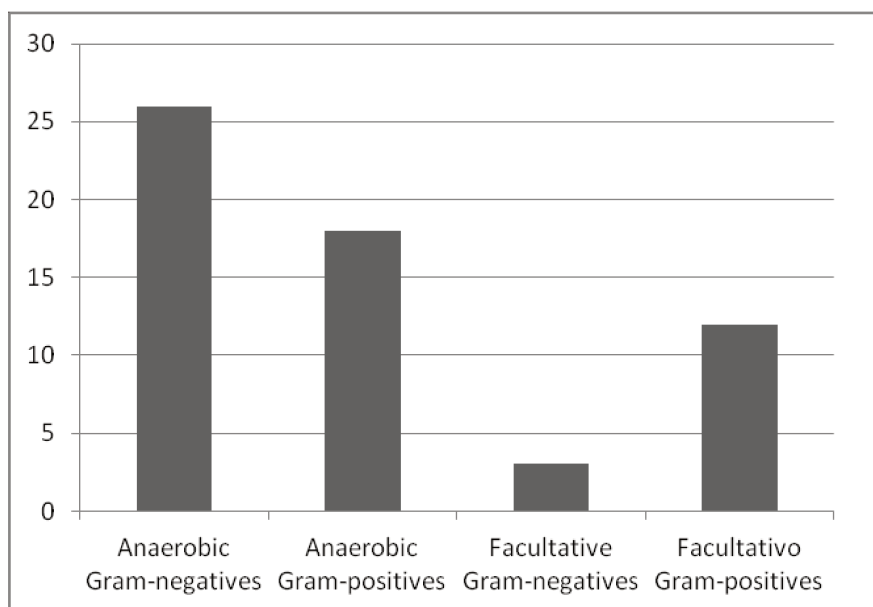


Figure 1 – Number of anaerobic, facultative, Gram-negative and Gram-positive strains identified by 16S rRNA sequencing.

The most frequently identified bacteria were *Prevotella buccae* (10/20), *Pseudoramibacter alactolyticus* (9/20), *Prevotella nigrescens* (8/20), *Parvimonas micra* (7/20), *Dialister invisus* (6/20), *Filifactor alocis* (4/20), *Prevotella tannerae* (4/20) and *Peptostreptococcus stomatis* (4/20).

Bacteria belonging to 6 phyla were detected, in an average number of 6 species per root canal. Twenty-five strains belonged to the phylum *Firmicutes*, which were the most frequently phylum, presented in 19 cases. The second most frequently phylum were *Bacteroidetes* (17 cases), followed by *Actinobacteria* (13 cases), *Proteobacteria* (7 cases), *Fusobacteria* (3 cases) and *Synergistetes* (2 cases) (**Figure 2**).

It was observed positive association between *Prevotella buccae* and *Pseudoramibacter alactolyticus* ($p < 0.05$; OR=9.333; IC=1.193-72.999), and between *Parvimonas micra* and *Prevotella nigrescens* ($p < 0.05$; OR= 18.333; IC= 1.508-222.875).

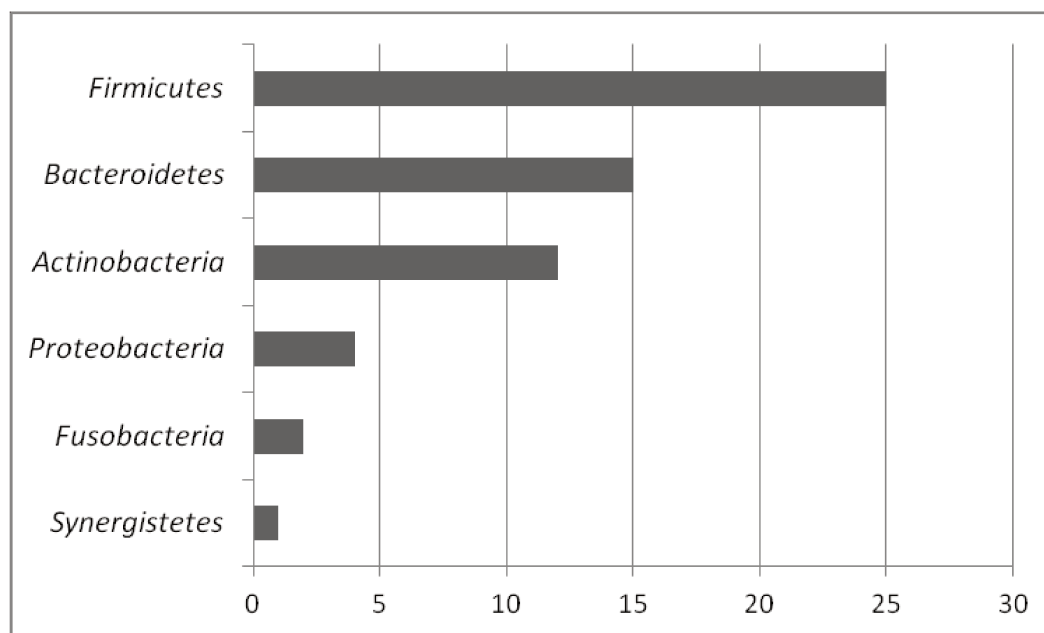


Figure 2 – Number of bacteria belonging to each phylum.

DISCUSSION

Two hundred and twenty strains were previously isolated on culture plate from 20 root canals and a wide range of anaerobic species were recovered from the root canals investigated. It is possible that some extremely oxygen-sensitive species might still not have been identified. Basic microbiological methods were adapted to recover as many anaerobic species as possible. These measures involved immediate inoculation of samples into an appropriate transport medium, which was promptly incubated under suitable gaseous conditions, and prolonged incubation was used to avoid overlooking slow-growing organisms. Nevertheless, it was not expected that the media employed could be suitable for growth of all microorganisms. For example, it was predictable that spirochaetes, shown to be present in other studies

(24), would not survive on the media plate used here and consequently not isolated, which was also observed by Siqueira et al. (25).

To date, there is no single method capable of recovering every microorganism found in the pulp space and related structures. To overcome the limitations of culture and biochemical identification methods, technological advances have allowed the introduction of molecular methods for bacterial identification, leading to a better understanding of endodontic infection profile (1, 6, 20, 23, 26).

The greatest advantage of open-ended molecular approaches for 16S rRNA analysis, such as cloning and sequencing of PCR products from polymicrobial infections, is the possibility of predicting the general microbiota involving fastidious and strain atypical phenotypic behavior, without searching for target species only. Usually, the initial 500-bp sequence of 16S rRNA gene provides adequate differentiation and is sufficient for identification of clinical isolates (27, 28).

Our methodology enabled the isolation of 220 strains and identification of 99% of isolates, including 59 different species identified. Similar results were found by Drancourt et al (29) and Song et al (30), who identified 90% and 86%, respectively, using 16S rRNA sequencing. Drancourt et al. (29) reported that the overall performance of 16S rRNA sequence analysis was excellent and succeeded in identifying phenotypically unidentifiable bacterial isolates. We also found it as 64 out of 65 phenotypically unidentified isolates were identified by molecular approach based on 16S rRNA analysis.

Prevotella spp., *Fusobacterium* spp., *Dialister invisus*, *Filifactor alocis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, and *Peptostreptococcus stomatis*, species frequently correlated with endodontic infections (2, 7-11, 13 18, 31) were identified in our study.

The present study has shown that the microbiota of root canal associated with AAA is more diverse than has been shown in previous studies based only in conventional identification methods (2, 10, 31), being predominated

by anaerobic Gram-negative bacteria. The average of 6 bacteria *per* root canal supports the polymicrobial feature of the primary endodontic infection. Moreover, some species were recovered in only 1 or 2 patients, thus corroborating the idea of heterogeneous bacterial communities between the subjects (5, 7).

Gram-negative species correlated with signs and symptoms of AAA were also frequently identified in this study by both methodologies, as follows: *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Dialister invisus*, *Dialister pneumosintes*, and *Filifactor alocis* (1, 2, 6-11, 16, 18, 31). The presence of Gram-negatives has clinical significance due to the presence of the endotoxin (lipopolysaccharide; LPS), which is a cell envelope constituent and can be secreted from cell vesicles. LPS has many biological activities, including fever induction, cytotoxicity, fibrinolysis, and can stimulate production of bradykinin, a potent pain mediator. Clinical investigations have elucidated the strong correlation between higher levels of endotoxin in root canals with spontaneous pain and clinical symptomatology, such as pain on palpation, tenderness to percussion, and exudation (12).

We have also detected a great number of Gram-positive bacteria, whose cell walls contain peptidoglycans and lipoteichoic acid. They are capable of influencing inflammatory reactions and enhance the pathogenicity of anaerobic Gram-negatives, mainly the black-pigmented ones (2, 10). *Parvimonas micra* and *Pseudoramibacter alactolyticus*, a Gram-positive anaerobes, was frequently isolated in our study in association with *Prevotella nigrescens* and *Prevotella buccae*, respectively.

The control or elimination of microorganisms and possible substrate must be the goal in every endodontic case. Considering the microbiological etiology of the disease, it is important to understand as much as possible the endodontic microbiota, in order to improve our prognosis and lead to the development of rational treatment strategies (5, 6).

It was concluded that infected root canals with acute apical abscess are microbiologically heterogeneous, composed mainly of anaerobic Gram-negatives, the majority belonging to the phylum *Firmicutes*, followed by *Bacteroidetes*.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors deny any conflicts of interest. This study was supported by the Brazilian Agencies FAPESP (2009/07760-5 & 2011/09047-4) and CNPQ (302575/2009). We would like to thank to Pâmela Pontes and Tiago Pereira da Rosa for technical support.

REFERENCES

- 1- Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21: 112-22.
- 2- Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA *et al*. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 71-6.
- 3- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod*. 2008; 34: 537-40.
- 4- Li L, Hsiao WWL, Nandakumar R, Barbuto SM, Mongoidn EF, Paster BJ, Fraser-Liggett CM, Fouad AF. Analyzing endodontic infection by deep coverage pyrosequencing. *J Dent Res*. 2010; 89: 980-4.
- 5- Siqueira JF, Roças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res*. 2009; 88: 61-5.
- 6- Yang QB, Fan LN, Shi Q. Polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis, cloning, and sequencing analysis of bacteria associated with acute periapical abscesses in childrens. *J Endod*. 2010; 36: 218-23.

- 7- Montagner F, Gomes BP, Kumar PS. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *J Endod.* 2010; 36: 1475-9.
- 8- Siqueira Jr JF, Roças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-direct polymerase chain reaction. *J Endod.* 2001a; 27: 164-7.
- 9- Siqueira Jr JF, Roças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2001b; 27: 563-6.
- 10- Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 285-92.
- 11- Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23: 282-90.
- 12- Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE2 production *J Endod.* 2011; 37: 602-7.
- 13- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002; 81: 761-6.
- 14- Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendran D, Shah HN. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 403-10.

- 15- Riggio MP, Aga H, Murray CA. Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103: 610–7.
- 16- Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Sanches PF, Gomes BPFA. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infection. *J Endod.* 2012; 38: 158-62.
- 17- Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. Identification and quantification of Archaea involved in primary endodontic infection. *J Clin Microb.* 2006; 44: 1274-82.
- 18- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L *et al.* Molecular identification of Microorganisms from endodontic infection. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3282-9.
- 19- Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR *et al.* Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failure endodontic treatment. *J Endod.* 2006; 32: 937-40.
- 20- Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra F, Figueiredo L, Fidel SR *et al.* A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infection. *J Endod.* 2009; 34: 541-5
- 21- Ribeiro AC, Matarazzo F, Faveri M, Zezell DM, Mayer MPA. Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *J Endod.* 2011; 37: 922-6.
- 22- Gomes BPA; Jacinto RC; Montagner F; Sousa ELR; Ferraz CCR. Analysis of the Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria Isolated from Endodontic Infections in Brazil during a Period of Nine Years. *J Endod.* 2011; 37: 1058-62.

- 23- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhrist FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology* 2001; 183: 3770-3783.
- 24- Jung IY, Choi BK, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001; 92: 329-34.
- 25- Siqueira JF, Roças IN, Paiva SSM, Magalhães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canal as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22: 266-71.
- 26- Siqueira JF, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1—current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005; 31: 411-23.
- 27- Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17: 840-62.
- 28- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JL. The Human Microbiome Project. *Nature.* 2007; 449: 804-10.
- 29- Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3623-30.
- 30- Song Y, Lui C, McTeague M, Finegold SM. 16 ribosomal sequence-based analysis of clinically significant gram-positive cocci. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 1363-9.
- 31- Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 253-8.

3 - CAPÍTULO 2

Bacterial diversity of symptomatic primary endodontic infection by clonal analysis

Nóbrega LMM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MAP, Gomes BPFA

Summary

Acute primary endodontic infections are one of the most frequently treated conditions in endodontic emergency procedures. It is a microbiologically heterogeneous disease presenting different bacterial profiles among the patients. Molecular methods of bacteria identification based on the 16S rRNA sequencing represent an important tool for both identification of pathogens and determination of the taxonomic position of microorganisms. The aim of this study was to explore the bacterial diversity of 10 root canals with acute periapical abscess by clonal analysis. Samples were collected from 10 patients, submitted to bacterial DNA extraction, 16S rRNA gene amplification, cloning, and sequencing. Bacterial genomic library was constructed and bacterial diversity was estimated. The mean number of taxa *per* canal was 15, ranging from 11 to 21. A total of 689 clones were analyzed and 76 phylotypes identified, of which 47 (61.84%) were different species and 29 (38.15%) were taxa reported as-yet-uncultivable or as yet-uncharacterized species. *Prevotella* spp., *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, and *Peptostreptococcus stomatis* were the most frequently detected species, followed by *Dialister invisus*, *Phocaeicola abscessus*, the uncharacterized *Lachnospiraceae oral clone*, *Porphyromonas* spp. and *Parvimonas micra*. Eight phyla were detected and the most identified taxa belonged to the phylum *Firmicutes* (43.5%), followed by *Bacteroidetes* (22.5%) and *Proteobacteria* (13.2%). No species was detected in all studied samples and some species were identified in only one case. It was concluded that acute primary endodontic infection is characterized by a wide bacterial diversity, in which anaerobic Gram-negatives are the most frequently detected microorganisms, belonging to the phylum *Firmicutes*, followed by *Bacteroidetes*.

Key-words: endodontics, microorganisms, dental abscess, bacterial diversity, clonal analysis, 16S rRNA gene sequencing.

INTRODUCTION

Acute endodontic infections are one of the most frequently treated conditions in endodontic emergency procedures. Clinically, they are characterized by spontaneous pain, tenderness to percussion, and pain on palpation. Microorganisms might reach the connective apical tissues, leading to an intense inflammatory response (Sousa *et al.*, 2003; Montagner *et al.*, 2010; Gomes *et al.*, 2011). The presence of soft-tissue swelling indicates diffusion through bone and if untreated, these infections might progress resulting in life-threatening conditions and systemic complications. The microbiota associated with endodontic infections is highly heterogeneous, presenting different bacterial profiles among the patients (Siqueira & Roças 2009; Montagner *et al.*, 2010).

About 700 bacterial species have already been identified in the oral microbiota. However, in the selective environment of root canal only certain microorganisms are able to survive and infect the system (Gomes *et al.*, 1994; Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2011; Ozok *et al.*, 2012). A limited number of species have been consistently isolated from endodontic infections due to the limitations of culture-depending methods, since approximately 50% of the oral microbiota is still uncultivable. Thus, the role of more fastidious or still uncultivable microorganisms in the pathogenesis and symptomatology of primary endodontic infections or persistent periradicular lesions may have been underestimated (Munson *et al.*, 2002; Sakamoto *et al.*, 2006; Vickerman *et al.*, 2007; Subramanian & Mickel, 2009; Dwehirst *et al.*, 2010).

Molecular methods of bacterial identification based on the 16S rRNA sequencing represent an important tool for both identification of cultivable and uncultivable pathogens and determination of their taxonomic position. The 16S rRNA gene has sufficient conserved regions for accurate alignment and enough variation for phylogenetic analysis (Chan & McLaughlin, 2000; Siqueira *et al.*, 2001; Clarridge, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2007).

Assessment of the human oral microbiome using metagenomic approaches, with genetic material recovered from oral cavity samples, revealed

that these techniques are sensitive and precise for evaluation of the bacterial diversity of root canal infections, making possible the identification of some unexpected pathogens or not often associated with endodontic infection (Siqueira & Roças 2005; Sakamoto *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2010; Dewhirst *et al.* 2010; Ribeiro *et al.* 2011).

In spite of the disseminated use of broad range molecular methods for bacterial identification and detection, and the high intraindividual variation in the microbial composition of endodontic samples, studies using cloned libraries analysis of endodontic microbiota usually evaluated a low number of samples, in symptomatic primary infection. Therefore, the aim of this study was to investigate the bacterial diversity of root canals with acute apical abscess.

METHODS

Patient Selection and Clinical Examination

Samples were collected from 10 patients who attended the Piracicaba Dental School, State University of Campinas (UNICAMP), for endodontic treatment due to spontaneous pain associated with root canal infections. The local human volunteers' research and ethics committee approved the study, and all patients signed an informed consent form.

The selection of patients was determined by their dental records as well as by clinical and radiographic examinations. Pulp necrosis, spontaneous pain, periapical lesion, and tenderness to percussion in the examined tooth were the inclusion criteria. The exclusion criteria comprised those patients who had received antibiotic therapy in the last 3 months, and/or presented pathology associated with periodontal disease.

Sampling Procedures

Root canals were sampled as previously described by Gomes *et al.* (2004) and Jacinto *et al.* (2007). Aseptic techniques were used throughout the endodontic sample acquisition. The sampling process was performed as follows:

dental caries and existing restorations were removed without exposing the canals; the tooth was isolated from the oral cavity with a rubber dam; the operatory field was then disinfected with 30% hydrogen peroxide followed by 2.5% sodium hypochlorite, which was inactivated with 5% sodium thiosulfate; and the root canals were exposed by using sterile burs under manual irrigation with sterile saline solution.

Sampling included only one root canal for each tooth. If the tooth was multi-rooted, either the largest canal in the root or the one with the periradicular radiolucency was sampled in order to confine the microbial evaluation to a single environmental site. A sterile paper point was introduced into the full length of the root canal, as determined in a preoperative radiograph, and kept in place for 60 seconds. In the case of a dry root canal, a second paper point, moistened in sterile saline solution, was used to ensure adequate sample acquisition. In the case of a wet root canal, as many paper points as needed were used to absorb all fluid inside the canal. The paper points were immediately transferred to a test tube containing 1 mL of Viability Medium Goteborg Anaerobic III (VMGA III).

DNA Extraction and Universal Amplification by PCR

Tubes containing the samples were shaken during 60 seconds and then 300uL of the transport medium were used to perform DNA extraction with QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions.

The universal amplification of 16S rRNA gene was performed by means of polymerase chain reaction (PCR), in a total volume of 50uL containing: 5µL of template DNA, 5µL of 10X PCR buffer, 1.5µL of 25 mmol/L MgCl₂, 4.0µL of dNTP solutions (25 mmol/L each), 1µL of 25 pmol forward universal primer (D88 - 5' GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG 3') and reverse universal primer (E94 - 5' GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA 3'), 0.5µL of 5U/mL of platinum Taq polymerase, and sterile distilled water to 50ul final volume (Paster *et al.*, 2001). The reagents were synthesized and provided by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA).

Genomic DNA of *P. gingivalis* (ATCC 33277) and sterile distilled water were used as positive and negative controls, respectively. The reaction was performed in a DNA thermocycler (GenePro Bioer, China) adjusted to initial denaturation step at 94°C for 4 minutes, followed by 30 cycles at 94°C for 45 seconds, 60°C for 45 seconds, 72°C for 90 seconds, and a final step at 72°C for 15 minutes.

Three independent PCR reactions were performed for each sample. The 1500-bp fragments were revealed after electrophoresis in 1% agarose gel, stained with 0.5uL/ml ethidium bromide and purified by using the kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen, North Rhine-Westphalia, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Clonal Analysis and 16S rRNA Sequencing

The 16S rRNA gene products were ligated into the pCR2.1-TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit - Invitrogen, Carlsbad, California, USA) and inserted into electrocompetent DH5α *Escherichia coli* by means of electroporation (MicroPulser, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). The transformed cells were plated onto Luria-Bertani agar plates supplemented with ampicillin (100mg/ml) and X-Gal (Promega), and then incubated overnight. Ninety-six white colonies *per* sample were randomly selected, suspended in 40μL of 10 mmol/L Tris-EDTA, and used as template (5μL) to determine the correct sizes of the inserts by PCR. Amplification reaction was performed with M13 forward (5' GTAAAACGACGGCCAG 3') and M13 reverse (5' CAGGAAACAGCTATGAC 3') primers. The cycling conditions comprised an initial denaturation at 94°C for 10 minutes and included 30 cycles at 94°C for 45 seconds, 60°C for 45 seconds, and 72°C for 90 seconds, followed by a final extension at 72°C for 10 minutes. The PCR products (approximately 1,500 bp) were submitted to electrophoresis in 1% agarose gel and purified with GTX PCR DNA Purification kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) before sequencing.

The concentrations of purified PCR products were verified by electrophoresis in 2% agarose gel by using Low Mass DNA Ladder. The purified

PCR products at concentration of approximately 40ng/μL were sequenced by using the ABI 3730 DNA Analyzer, with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California, EUA) using primer 533R (5' TKACCGCGGCTGCTG 3') (Ribeiro *et al.*, 2011).

Data Analysis

Sequences with more than four ambiguous characters were discarded. Sequences of approximately 500-700 bases were obtained from each amplicon, and the identity/approximate phylogenetic position was obtained by comparison with 16S rRNA gene sequences from the GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov) through the basic local alignment search tool (BLAST) algorithm considering a 98% similarity level.

Bionumerics software (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Belgium) was used for data entry, editing, sequence alignment, structure comparison, secondary structure comparison, similarity matrix generation, and phylogenetic tree construction. The similarity matrices were corrected for multiple base changes at a single position by the method of Jukes and Cantor. Phylogenetic trees were constructed by using the un-weighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) method (Ribeiro *et al.*, 2011).

RESULTS

A total of 799 cloned 16S rRNA fragments were sequenced. Sequences with more than 4 ambiguous characters or fragment shorter than 500 bp length were discarded, resulting in 689 appropriate sequences, which were used for phylogenetic analysis.

The number of clones analyzed in each case ranged from 55 to 86, depending on the fragment sequence quality. Considering the microbiota recovered in each case, it was estimated the proportion of each phylotype identified. Most of the species and phylotypes identified in this study represented

less than 10% of the total microbiota recovered in each sample. However, some species comprised more than 30% of the microbiota *per* sample.

The mean number of bacterial taxa *per* canal ranged from 11 to 21, with the majority of them being anaerobic Gram-negative bacteria. The phylogenetic tree, constructed based on the 16S rRNA gene sequence comparison of 1,500 aligned bases (Jukes and Cantor method), is shown in **Figure 1**.

Prevotella oris represented more than 10% of the total microbiota, and was recovered in Cases 4 and 5. The other species of this genus represented less than 10%. *Phocaeicola abscessus* represented more than 30% of the microbiota recovered in Case 10. Moreover, species recovered in only one sample, such as *Exiguobacterium mexicanum*, *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus intermedius*, were found in high proportion (over 30%) in these samples. *Veillonella parvula*, *Micrococcus flavus*, *Acinetobacter lwoffii* and *Paracoccus sp.* represented more than 10% of the microbiota of the samples that were positive for these species (**Figure 1**).

The most detected taxa belonged to the phylum *Firmicutes* (43.5% of the identified taxa), detected in all 10 samples, followed by phylum *Bacteroidetes* (22.5%), detected in 9 samples. The phylum *Fusobacteria* represented only 3.9% of the identified taxa, however it was present in 7 samples. The phylum *Proteobacteria* (13.2%) was detected in 5 samples, *Actinobacteria* (6.5%) in 4 samples, *Synergistetes* (5.2%) and *Spirochaetes* (3.9%) in 2 samples, and *Deinococcus-Thermus* (1.3%) in 1 sample. There was no case harboring all the eight detected phyla. It was observed a high inter-subject variability. For example, case 6 presented only *Firmicutes* and *Bacteroidetes*, in a total of 11 phylotypes, whereas case 8 presented *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes* and *Synergistetes*, in a total of 21 different phylotypes.

Seventy-six phylotypes were identified in this study, of which 47 (61.84%) were different species and 29 (38.15%) were taxa reported as-yet-unculturable or uncharacterized species. Forty-three phylotypes were present in only one sample.

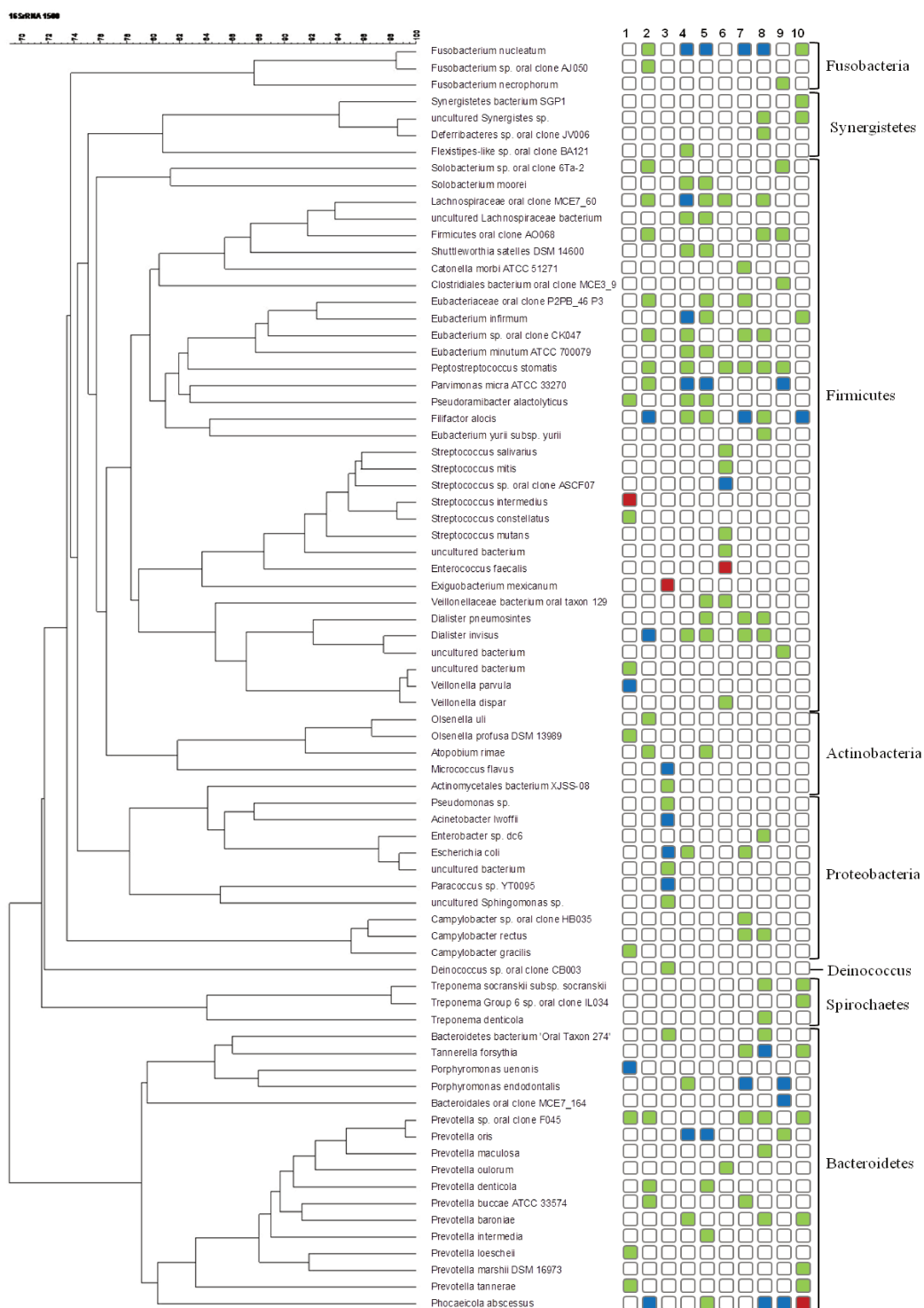


Figure 1 - Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (1500bp). Scale bar represents percentage sequence similarity. The column of boxes represents the bacterial profile of each patient (n=10), and proportion is indicated by the following colours: white (absence), green (<10%), blue (10%-30%) and red (>30%).

Species from genus *Prevotella*, including *P. baroniae*, *P. buccae*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. maculosa*, *P. marshii*, *P. oris* and *P. oulorum* were detected in 9 out of the 10 samples studied. *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis* and *Peptostreptococcus stomatis* were the most frequently detected species (6/10 canals), followed by *Dialister invisus*, *Phocaeicola abscessus*, *Eubacterium* spp., the uncharacterized *Lachnospiraceae oral clone* (5/10 canals), *Porphyromonas* spp. and *Parvimonas micra* (4/10 canals). **Figure 2** shows the number of cases where the most frequently bacteria were detected.

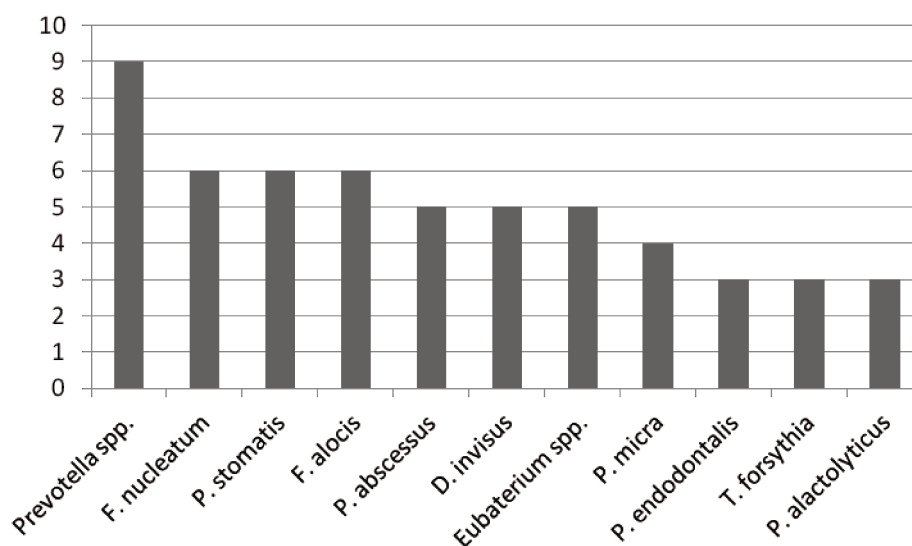


Figure 2 – Number of cases presenting the most frequently bacteria identified

DISCUSSION

The results of this study showed that the microbiota of root canals of teeth with primary endodontic infection and periapical abscess is polymicrobial and dominated by anaerobic Gram-negative bacteria. A significant number of Gram-positives have also been detected such as *Parvimonas micra*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Peptostreptococcus stomatis* and *Eubacterium* spp. The number of

different species identified in each sample ranged from 11 to 21, whereas culture-depending methods showed an average of 5-7 species *per* case (Gomes *et al.*, 2004; Munson *et al.*, 2002; Siqueira *et al.*, 2007).

Bacterial profiles of endodontic infections varied from individual to individual. No species was present in all samples, and the number of patients analyzed allowed the observation of a bacterial diversity higher than that reported by other studies (Munson *et al.*, 2002, Sakamoto *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2007). This indicates that primary endodontic infection has a heterogeneous etiology, where no single species can be considered as the main endodontic pathogen. Multiple bacterial combinations play a role in disease etiology, acting synergistically and increasing their virulence, which leads to further damage to the host (Siqueira *et al.*, 2001; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Jacinto *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2008; Montagner *et al.*, 2010; Martinho *et al.*, 2011). As-yet-unknown species are also present in disease infections, which give rise to new concepts in the pathogenesis of several human infections and redirect the therapeutic strategies. Our results showed uncultured bacteria in 8 cases.

Specific oral bacteria, some of them detected in this study, such as *Solobacterium moorei*, *Phocaeicola abscessus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia* have been related to several systemic diseases including bacterial endocarditis, aspiration pneumonia, osteomyelitis, brain abscess, pre-term low birth weight, cardiovascular disease, and obesity (AAS *et al.*, 2005; Detry *et al.*, 2006; Goodson *et al.*, 2009; Al-Masalma *et al.*, 2009), thus emphasizing the importance of the accurate microbial identification.

Culture is not representative of the composition of a microbial community, especially for fastidious and as-yet-uncultivable species. The greatest advantage of open-ended molecular approaches of 16S rRNA analysis, such as cloning and sequencing of PCR products from polymicrobial infections, is the possibility of predicting the general micro-flora involving fastidious, slow-growing or not-yet-cultivable bacteria, without searching for target species only. Usually, the

initial 500-bp sequence of 16S rRNA gene provides adequate differentiation and is sufficient for identification of clinical isolates (Clarridge, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2007).

Cloning and sequencing do not indicate bacterial viability, which is available by assays directed towards the detection of mRNA through RT-PCR. Although there is a possibility of detecting DNA from dead cells in endodontic infections, this possibility is conceivably low. It is highly unlikely that free bacterial DNA can remain intact in an environment colonized by living microorganisms. Dnases released by some living species as well as at cell death can degrade free DNA in the environment (Siqueira & Roças, 2005). Furthermore, designing primers to generate large amplicons may reduce the risks of the detection of dead cells. Thus, the species detected here probably represent endodontic pathogens that play an important role in the acute infection studied.

Bacteria detected in this research were distributed into 8 phyla: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Synergistetes*, *Fusobacteria*, *Spirochaetes* and *Deinococcus*. These data are in agreement with those provided by human microbiome, periodontal and endodontic infection studies (Paster *et al.*, 2001; Siqueira *et al.* 2005; Vickerman *et al.*, 2007; Dewhirst *et al.*, 2010; Ribeiro *et al.*, 2011).

Deinococcus sp, detected in only 1 sample, belongs to the phylum *Deinococcus-Thermus*. It was previously known to exist only in extreme environments and animal feces, until it was recently identified in human stomach and endodontic infection (Li *et al.*, 2010).

Synergistetes is a recent described phylum that includes *Flexistipes-like* sp. and *Deferribacteres* sp., being previously misclassified as belonging to the phylum *Deferribacteres* (Siqueira & Roças, 2009; Dewhirst *et al.*, 2010), and reported as important components of endodontic infection (Siqueira *et al.*, 2005; Jacinto *et al.*, 2007; Vianna *et al.*, 2007). However, *Synergistetes* were not detected by Vickerman *et al.* (2007) and Saito *et al.* (2006).

Some important named bacterial species frequently detected in the present study had already been found in endodontic infections by culture-dependent and molecular approaches, such as *Fusobacterium nucleatum*, *Dialister* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., *Filifactor alocis*, and *Streptococcus* spp., confirming their status of endodontic pathogens (Baumgartner *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006; Chugal *et al.*, 2011). However, our results disagree with those reported by Munson *et al.* (2002), Rolph *et al.* (2001), Saito *et al.* (2006), who did not find *F. nucleatum*, *P. micra* and *Porphyromonas* spp. by clonal analysis.

The presence of Gram-negatives is important, regarding to both host inflammatory response and clinical significance, due to the presence of endotoxins (lipopolysaccharide; LPS), which are cell envelope constituents and can be secreted from cell vesicles. LPS has many biological activities, including fever induction, cytotoxicity, fibrinolysis, and stimulation of the production of bradykinin, a potent pain mediator. Clinical investigations had elucidated the strong correlation between higher levels of endotoxins in root canals with spontaneous pain and clinical symptomatology such as pain on palpation, tenderness to percussion, and exudation (Horiba *et al.*, 1991; Jacinto *et al.*, 2005; Martinho & Gomes, 2008).

Prevotella oris and *Prevotella baroniae*, newly named species, are some of the most prevalent *Prevotella* species in endodontic infection (Roças & Siqueira, 2009). *Porphyromonas gingivalis* associated with *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* form the so-called red-complex, which is significantly associated with periodontal disease severity and endodontic infection (Gomes *et al.*, 2007; Siqueira *et al.*, 2008). Although *T. forsythia* and *T. denticola* were detected in Case 8, *P. gingivalis* was not detected in any of the root canals investigated.

Dialister spp. and *Filifactor alocis*, species difficult to be identified by biochemical methods, and *Fusobacterium nucleatum*, species frequently associated with symptomatology (Siqueira & Roças, 2003; Saito *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2007), were detected in 50% of the root canals. *Dialister* spp. are

extremely small (0.4µm) and it is interesting to speculate whether these organisms would be able to penetrate dentinal tubules (Munson *et al.*, 2002).

The occurrence of *Spirochaetes* in endodontic infection has long been obscured by the difficulties in culturing these microorganisms (Siqueira *et al.*, 2005). Nowadays, molecular approaches revealed a higher prevalence of oral Treponemas, which are abundant in subgingival samples of periodontitis patients (Paster *et al.*, 2001; Dewhirst *et al.*, 2010). In our results, Treponemas were found in only 2 samples and our patients were free of periodontitis, suggesting the absence of cross-contamination from periodontal pockets, which is in agreement with Ribeiro *et al.* 2011.

Phocaeicola abscessus is a Gram-negative coccobacilli bacteria, strictly anaerobic, asaccharolytic, non-pigmented, non-spore-forming and motile, member of the phylum *Bacteroidetes*. This species was isolated from brain abscess, described by Al-Masalma *et al.* (2009), and was detected in 50% of our samples, corresponding to more than 30% of the microbiota recovered in case 10, more than 10% in case 2, 8 and 9. No previous study reported this species in endodontic infection, although it is very similar (99% of similarity) to sequences of previously described uncultured bacteria (GenBank access number AF481203 and AY005066) from endodontic infections (Al-Masalma *et al.*, 2009).

We have also detected a great number of Gram-positive bacteria, such as *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, and *Eubacterium spp.* Their cell walls contain peptidoglycans and lipoteichoic acid, which are also capable of influencing inflammatory reactions and enhancing the pathogenicity of anaerobic Gram-negatives, mainly the black-pigmented ones (Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004).

Enterococcus faecalis, facultative gram-positive cocci, widely associated with failed endodontic treatment (Gomes *et al.*, 2008; Subramanian & Mickel 2009), has also been detected in primary endodontic infection (Gomes *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2007). However, in the present study, this species was detected in only 1 sample.

Shuttleworthia satelles, *Catonella morbi*, *Acinetobacter lwoffii*, *Micrococcus flavus* and *Exiguobacterium mexicanum*, species that have been recently associated with endodontic infection by molecular methods, were also detected here despite their low frequency (Downes *et al.*, 2002; Munson *et al.* 2002; Siqueira & Roças, 2006; Jacinto *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2011).

It has become clear from diverse studies using different microbiological techniques that microbial specificity in the etiology of apical periodontitis is relatively low. However, the fact that some species are more prevalent than others may be indicative that they are also more significant when it comes to endodontic infection and periapical lesions. Although there is the possibility that some species present in endodontic infections are mere bystanders, it is by and large recognized that some of the species can play at least an ecological role in the community. As a consequence, their participation in the disease process cannot be refuted (Siqueira & Roças, 2006; Jacinto *et al.*, 2007).

In conclusion, the clonal analysis of acute primary endodontic infections revealed a wide diversity of species infecting the root canals. It was detected not only species usually isolated in culture studies but also species that are difficult to culture and that have been proven to be endodontic pathogens by reports employing molecular approaches. However, the specific role played by each of these species in the endodontic bacterial community awaits further clarification.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Brazilian Agencies FAPESP (2009/07760-5 & 2011/09047-4) and CNPQ (302575/2009). We would like to thank Pâmela Pontes and Ericka Pinheiro for technical support.

REFERENCES

- 1- Aas, J.A., Paster, B.J., Stokes, L.N., Olsen I, Dewhirst, F.E. (2005) Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* **43**: 5721-32.
- 2- Al-Masalma, M., Raoult, D., Roux, V. (2009) *Phocaeicola abscessus* gen. Nov., sp. Nov., an anaerobic bacterium isolated from human brain abscess sample. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**: 2232-7.
- 3- Baumgartner, J.C., Lhemaleelakul, S.U., Xia, T. (2003) Identification of spirochetes (*Treponemes*) in endodontic infections. *J Endod* **29**: 794-7.
- 4- Chan, E.C.S., McLaughlin, R. (2000) Taxonomy and virulence of oral spirochetes. *Oral Microbiol Immunol* **15**: 1-9.
- 5- Chen V, Chen Y, Li H, Kent K. (2009) Herpesviruses in Abscesses and cellulitis of endodontic origin. *J Endod* **35**: 182-8.
- 6- Chugal N, Wang JK, Wang R, He X, Kang M, Li, J., Zhou, X., Shi, W., Lux, R. (2011) Molecular characterization of the microbial flora residing at the apical portion of infected root canals of human teeth. *J Endod* **37**: 1359-64.
- 7- Clarridge, J.E. 3rd. (2004) Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **17**: 840-62.
- 8- Detry, G., Pierard, D., Vandoorslaer, K., Wauters, G., Avesani, V., Glupczynski, Y. (2006). Septicemia due to *Solobacterium moorei* in patient with multiple myeloma. *Anaerobe* **12**: 160-2.
- 9- Dewhirst, F.E.; Chen, T.; Izard, J.; Paster, B.J.; Tanner, A.C.R.; Yu, W.H., Lakshmanan A, Wade WG. (2010) The human oral microbiome. *J Bacteriol* **192**: 5002-17.

- 10-Downes, J., Munson, M.A., Radford, D.R., Spratt, D.A., Wade, W.G. (2002) *Shuttleworthia satellites* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**: 1469-75.
- 11-Faveri, M., Gonçalves, L.F.H., Feres, M., Figueiredo, L.C., Gouveia, L.A., Shibli, J.A., Mayer, M.P.A. (2011) Prevalence and microbiological diversity of Archaea in peri-implantitis subjects by 16S ribosomal RNA clonal analysis. *J Periodont Res* **46**: 338-44.
- 12-Gomes, B.P.F.A., Drucker, D.B., Lilley, J.D. (1994) Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* **27**: 291-8.
- 13-Gomes, B.P.F.A.; Jacinto, R.C.; Montagner, F.; Sousa, E.L.R.; Ferraz, C.C.R. (2011) Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod* **37**: 1058-62.
- 14- Gomes, B.P.F.A., Montagner, F., Jacinto, R.C., Zaia, A.A., Ferraz, C.C.R., Souza-Filho, F.J. (2007) Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod* **33**:1049-52.
- 15-Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira, F.B., Souza-Filho, F.J. (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* **19**: 71-6.
- 16-Gomes, B.P.F.A., Pinheiro, E.T., Sousa, E.L.R., Jacinto, R.C., Zaia, A.A., Ferraz, C.C.R., Souza-Filho, F.J. (2006) *Enterococcus faecalis* in dental root canals detect by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**: 247-53.
- 17-Goodson, J.M., Groppo, D., Halem, S., Carpino, E. (2009) Is obesity an oral disease? *J Dent Res* **88**: 519-23.

- 18-Horiba, N., Maekawa, Y., Abe, Y., Ito, M., Matsumoto, T., Nakamura, H. (1991) Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **71**:492–5.
- 19-Jacinto, R.C., Gomes, B.P., Ferraz, C.C., Zaia, A.A., Souza-Filho, F.J. (2003) Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria *Oral Microbiol Immunol* **18**: 285-92.
- 20-Jacinto, R.C., Gomes, B.P.F.A., Shah, H.N., Ferraz, C.C., Zaia, A.A., Souza-Filho, F.J. (2005) Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol* **54**: 777–83.
- 21-Jacinto, R.C., Gomes, B.P., Desai, M., Rajendran, D., Shah, H.N. (2007) Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol* **22**: 403-10.
- 22-Kumar, O.S., Griffen, A.L., Moeschberger, M.L., Leys, E.J. (2005) Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S by clonal analysis. *J Clin Microbiol* **43**: 3944-55.
- 23-Li, L., Hsiao, W.W.L., Nandakumar, R., Barbuto, S.M., Mongoidn, E.F., Paster, B.J., Fraser-Liggett, C.M., Fouad, A.F. (2010) Analyzing endodontic infection by deep coverage pyrosequencing. *J Dent Res* **89**: 980-4.
- 24-Martinho, F.C., Chiesa, W.M.M., Leite, F.R.M., Cirelli, J.A., Gomes, B.P.F.A. (2011) Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE2 production. *J Endod* **37**: 602-7.

- 25- Martinho, F.C., Gomes, B.P.F.A. (2008). Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* **34**:268-72.
- 26-Montagner, F., Gomes, B.P.F.A., Kumar, P.S. (2010) Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *J Endod* **36**: 1475-9.
- 27-Montagner, F., Jacinto, R.C., Signoretti, F.G.C., Sanches, P.F., Gomes, B.P.F.A. (2012) Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infection. *J Endod* **38**: 158-62.
- 28-Munson, M.A., Pitt-Ford, T., Chong, B., Weightman, A., Wade, W.G. (2002) Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* **81**: 761-6.
- 29-Ozok, A.R., Persoon, I.F., Huse, S.M., Keijser, B.J.F., Wesselink, P.R., Crielaard, W., Zaura, E. (2012) Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *Int Endod J* **45**: 530-41.
- 30-Paster, B.J., Boches, S.K., Galvin, J.L., Ericson, R.E., Lau, C.N., Levanos, V.A., Sahasrabudhe, A., Dewhirst, F.E. (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology* **183**: 3770-3783.
- 31-Ribeiro, A.C., Matarazzo, F., Faveri, M., Zezell, D.M., Mayer, M.P.A. (2011) Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *J Endod* **37**: 922-6.
- 32-Roças, I.N., Siqueira, J.F. (2009) Prevalence of new candidate pathogens *Prevotella baroniae*, *Prevotella multisaccharivorax* and as-yet-uncultivated *Bacteroidetes* clone X083 in primary endodontic infection. *J Endod* **35**: 1359-62.

- 33-Rolph, H.J., Lennon, A., Riggio, M.P., Saunders, W.P., MacKenzie, D., Coldero, L., Bagg, J. (2001) Molecular identification of Microorganisms from endodontic infection. *J Clin Microbiol* **39**: 3282-9.
- 34-Saito, D., Leonardo, R.T., Rodrigues, J.L., Tsai, S.M., Hofling, J.F., Goncalves, R.B. (2006) Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol* **55**: 101-7.
- 35-Sakamoto, M., Roças, I.N., Siqueira, J.F., Benno, Y. (2006) Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* **21**: 112-22.
- 36-Siqueira, J.F., Roças, I.N. (2003) Detection of *Filifactor alocis* in endodontic infections associated with different forms of periradicular disease. *Oral Microbiol Immunol* **18**: 263-265.
- 37-Siqueira, J.F., Roças, I.N. (2005) Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 - current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* **31**: 411-23.
- 38-Siqueira, J.F., Roças, I.N. (2006) *Catonella morbi* and *Granulicatella adiacens*: new species in endodontic infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **102**: 259-64.
- 39-Siqueira, J.F., Roças, I.N. (2009) The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res* **88**: 61-5.
- 40-Siqueira, J.F., Roças, I.N., Oliveira, J.C.M., Santos, K.R.N. (2001) Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-direct polymerase chain reaction. *J Endod* **27**: 164-7.
- 41-Siqueira, J.F., Roças, I.N., Cunha, C.D., Rosado, A.S. (2005) Novel bacterial phylotypes in endodontic infections. *J Dent Res* **84**: 565-9.

- 42- Siqueira, J.F., Roças, I.N., Paiva, S.S.M., Magalhães, K.M., Guimarães-Pinto, T. (2007) Cultivable bactéria in infected root canal as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol* **22**: 266-71.
- 43-Siqueira, J.F., Roças, I.N., Silva, M.G. (2008) Prevalence and clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections. *J Endod* **34**: 1332-36.
- 44-Sousa, E.L.R., Ferraz, C.C.R., Gomes, B.P.F.A., Pinheiro, E.T., Texeira, F.B., Souza-Filho, F.J. (2003) Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **96**: 332-9.
- 45-Subramanian, K., Mickel, A.K. (2009) Molecular analysis of persistent periradicular lesion and root ends reveals a diverse microbial profile. *J Endod* **35**: 950-7.
- 46-Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C.M., Knight, R., Gordon, J.I. (2007) The human microbiome project. *Nature* **449**: 804-10.
- 47-Vianna, M.E., Conrads, G., Gomes, B.P.F.A., Horz, H.P. (2007) Quantification and characterization of *Synergistetes* in endodontic infection. *Oral Microbiol Immunol* **22**: 260-5.
- 48-Vianna, M.E., Horz, H.P., Conrads, G., Feres, M., Gomes, B.P.F.A. (2008) Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol* **23**: 282-90.
- 49-Vickerman, M.M., Brossard, K.A., Funk, D.B., Jesionowski, A.M., Gill, S.R. (2007) Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J Med Microbiol* **56**: 110-8.
- 50-Yang, Q.B., Fan, L.N., Shi, Q. (2010) Polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis, cloning, and sequencing analysis of bacteria associated with acute periapical abscesses in childrens. *J Endod* **36**: 218-23.

4 - CAPÍTULO 3

Comparison between biochemical and molecular identification of bacteria isolated by culture from infected root canal with acute apical abscesses

Nóbrega LMM, Montagner F, Ribeiro AC, Mayer MAP, Gomes BPFA

ABSTRACT

Culture and biochemical methods for microbial identification, frequently used in clinical laboratory, require the recognition of differences in morphology, growth requirements, enzymatic activity, and metabolism to define genera and species. Different from the phenotypic methods, the 16S rRNA sequencing allows a better identification of microorganisms and overcome some limitations of conventional biochemical bacterial identification. The aim of this present study was to compare the identification of cultivable bacteria by biochemical tests (phenotypic method) and by 16S rRNA gene sequencing (genotypic method). Two hundred twenty strains isolated by microbiological culture and identified phenotypically by means of biochemical methods were submitted to DNA extraction and amplification of the 16S rRNA gene (PCR), followed by sequencing. The nucleotides sequences obtained were compared to those from gene bank of the National Center of Biotechnology Information through the BLAST. Sequencing allowed the identification of 97% of isolates (215/220) against 70,5% (155/220) identified biochemically. Thirty-four different species were identified by biochemical methods and 57 by sequencing. Strains not identified biochemically were characterized in 97% (63/65) by sequencing. There was an agreement of 49% between the biochemical and 16S rRNA gene sequencing identification, 27.7% at genus level and 21.3% at specie level. There was a statistically significant agreement between the methods in the identification of *Prevotella buccae*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* and *Propionibacterium acnes*. It was concluded that 16S rRNA sequencing can offer a more consistently reliable and accurate method for bacterial identification, allowing the characterization of biochemically unidentified strains.

Key-words: Bacterial identification, Biochemical methods, 16S rRNA Sequencing, Endodontic Microbiota, Acute Apical Abscess

INTRODUCTION

Traditionally, cultivable bacteria isolated from infected root canal have been identified by phenotype-based methods. These tests have been miniaturized and semiautomated, leading to major progress in diagnostic accuracy (Bosshard *et al.*, 2004), and include growth requirements, isolation, colony morphologies, Gram stain results, enzymatic and/or metabolic activities (Gomes *et al.*, 1994). However, these characteristics are not static and can change with stress or evolution (Shah e Gharbia, 1993; Petti *et al.*, 2005; Vianna *et al.* 2005; 2008). Thus, biochemical methods have limitations such as: identification of bacteria presenting a atypical phenotypes, not all strains within a given species may exhibit a common characteristic; when unusual microorganisms are not present in reference databases of biochemical kits, or when databases are out of date. Technologist bias or inexperience may lead to errors on the results interpretation due to the subjective judgment and personnel's expertise (Alexander *et al.*, 1997; Dahlén, 2002; Bosshard *et al.*, 2004; Weile e Knabbe, 2009; Schirrmeister *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2012).

Small alterations in the execution of an assay may give false test results, consequently, identification based on phenotypic tests does not always allow an unequivocal identification. In some circumstances, even the successful culturing of the given microorganism does not necessary means that it can be correctly identified and on this way bacteria can be misidentified (Petti *et al.*, 2005; Siqueira & Roças, 2005a; 2009b; Schirrmeister *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010; Ferreira *et al.*, 2012). Molecular approaches can sidestep many of these limitations. Among them, the 16S rRNA phylogenetic methodology has emerged as a more objective, accurate, and reliable tool for identifying bacterial isolates and for diagnosing microbial infections, widening the scope of detectable microorganisms (Bosshard *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006; Vickerman *et al.*, 2007; Schirrmeister *et al.*, 2009).

Different from the phenotypic methods the 16S rRNA gene sequencing allows a better identification of bacteria and provides unambiguous data for rare

isolates or poorly described, and phenotypically aberrant species (Petti *et al.*, 2005; Sakamoto *et al.*, 2006; Siqueira *et al.*, 2007, Ferreira *et al.*, 2012). Full or partial 16S rRNA gene sequencing methods have emerged as useful tools for identifying because this gene has sufficient conserved regions to accurate alignment, and variation sufficient to phylogenetic analysis. Usually, the initial 500-bp sequence of 16S rRNA gene provides adequate differentiation and is sufficient for identification of clinical isolates (Chan e McLaughlin, 2000; Siqueira *et al.*, 2001a; Patel, 2001; Clarridge, 2004; Turnbaugh *et al.*, 2007).

Ferreira et al (2012) suggest that DNA analysis is the preferential method for microorganism identification because of its high specificity and sensitivity. Some strains that are not identified at the species level or are identified erroneously by conventional phenotypic tests can be identified correctly by genotypic techniques.

Acute apical abscesses (AAA), one the most frequently treated conditions in endodontic emergency procedures, result from the extension of the infection initially, present within the root canal system, into the periradicular area (Brook *et al.*, 1981). The establishment of an AAA depends on the presence of a highly virulent infection in the root canal that overcomes the body's defense system (Torabinejad, 1994). If untreated, the infection might progress to cause further tissue damage and accumulation of purulence, resulting in severe pain and swelling, resulting in a possible source of serious orofacial infection and life-threatening conditions (Siqueira & Roças, 2009b; Montagner *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

Microorganisms growing on culture plates may exist in higher number in root canals among those that are cultivable, and their number and virulence are directly related to the disease, therefore it would be important to identify, correctly, such microorganisms present in the root canals with acute endodontic disease. There is no research in the endodontic literature comparing the biochemical identification with the 16S rRNA gene sequencing of the bacteria isolated by culture from root canals associated with AAA. The aim of this present study was to

compare the identification of cultivable bacteria by biochemical tests (phenotypic method) and by 16S rRNA gene sequencing (genotypic method).

MATERIAL AND METHODS

Samples were collected from 20 patients who attended the Piracicaba Dental School, State University of Campinas (UNICAMP), for endodontic treatment due to spontaneous pain associated with root canal infections. The local Human Volunteers Research and Ethics Committee approved the study, and all patients signed an informed consent form.

Patient selection and clinical examination

The selection of patients was determined by their dental records as well as clinical and radiographic examination. Inclusion criteria involved report of pulp necrosis, spontaneous pain, periapical lesion and pain to percussion in the examined tooth. In addition, patients who had not received antibiotic therapy in the last 4 months, excluding pathology associated with periodontal disease, were selected for this study.

Root Canal Sampling and Biochemical identification

Root canal sampling and culturing methods for microbial isolation and identification were performed as described previously by Montagner *et al.* (2010) and Gomes *et al.* (2004; 2011).

Dental caries and existing restorations were removed without exposure of the canals. The tooth was isolated from the oral cavity with a rubber dam. The operative field was disinfected with 30% hydrogen peroxide, followed by 2.5% sodium hypochlorite, which was inactivated with 5% sodium thiosulphate. The root canals were exposed by using sterile burs under manual irrigation with sterile saline solution. Samples were taken from both external tooth surface and operative field after disinfection to guarantee the absence of contaminants. No positive

growth should be observed for these two samples. If so, the respective root canal sample was immediately excluded from the study.

If the tooth was multi-rooted, either the largest canal in the root or the one with periradicular radiolucency was sampled to confine the microbial evaluation to a single environmental site. A sterile paper point was introduced into the full length of the root canal as determined in a preoperative radiograph and then kept in place for 60 seconds. In the case of a dry root canal, a second paper point moistened in sterile saline solution was used to ensure adequate sample acquisition. In the case of a wet root canal, as many paper points as needed were used to absorb all the fluid inside the canal. Next, the paper points were immediately transferred to a test tube containing 1 ml of VMGA III.

In the anaerobic chamber, the endodontic samples were serially diluted 10 times in tubes containing Fastidious Anaerobe Broth (FAB, Laboratory M, Bury, UK). A 50- μ l sample of each serial dilution as well as of the undiluted sample were plated onto fastidious anaerobe agar (FAA, Laboratory M) with 5% defibrinated sheep blood and containing 1 ml/l of haemin and 1 ml/l of vitamin K1. Bacterial plates were incubated at 37°C under anaerobic conditions (10% CO₂, 10% H₂, and 80% N₂) for up to 14 days. Samples were also plated onto brain heart infusion (BHI) agar with 5% sheep blood (Oxoid, Basingstoke, UK) to allow growth of aerobic and facultative anaerobic microorganisms. The BHI plates were aerobically incubated at 37°C for 2 days.

From each bacterial plate, representative colonies of each morphologic type were cultured. Pure cultures were initially characterized according to their gaseous requirements, Gram-stain characteristic, and ability to produce catalysis. The purity of isolates was determined by macroscopic examination of colonies and microscopic examination of bacteria after Gram-staining. Then, the following identification kits were used for primary specification of individual isolates: Rapid ID 32 A (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France) for strict anaerobes; API Staph (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France) for staphylococci; Api Strep (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France) for streptococci, and Rapid NH System (Innovative Diagnostic

Systems Inc., Atlanta, GA, USA) for *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella* and *Actinobacillus*.

Complementary tests were also used to ensure the identification of bacteria from the genera *Prevotella* and *Porphyromonas*: Fluorescence under long-wave (366nm) UV light – Black-Ray lamp, model UVL-56 (UVP Inc, San Gabriel CA); Lactose fermentation by application of fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- β -galactoside (Sigma Chemical Co. St Louis, MO – M-1633); and trypsin-like activity by applying synthetic fluorogenic peptide L-arginin-7-amino-4-methylcoumarin amido-HCl.

16S rRNA Sequencing

The DNA of each previously isolated bacteria, which were stored at -80°C, was extracted by using QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. After extraction, the universal amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) was performed in a total volume of 50 μ L containing: 5 μ L of template DNA, 5 μ L of 10X PCR buffer, 1.5 μ L of 25 mmol/L MgCl₂, 4.0 μ L of dNTP solutions (25 mmol/L each), 1 μ L of 25 pmol forward and universal primer (D88 - 5' GAGAGTTTGATYMTGGCTCAG 3') and reverse universal primer (E94 - 5' GAAGGAGGTGWTCCARCCGCA 3'), 0.5 μ L of 5U/mL Platinum Taq Polymerase and 32 μ L of sterile distilled water (Paster *et al.*, 2001). The reagents were synthesized and provided by Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Genomic DNA of *P. gingivalis* (ATCC 33277) and sterile distilled water were used as positive and negative controls, respectively. The reaction was performed in a DNA thermocycler (GenePro, Bioer-Technology, Hangzhou, China) adjusted to initial denaturation step at 94°C for 4 minutes followed by 30 cycles at 94°C for 45 seconds (denaturation), 60°C for 45 seconds (annealing), 72°C for 90 seconds (extension), and a final extension step at 72°C for 15 minutes.

Two independent PCRs were performed for each sample and the PCR products were submitted to electrophoresis in 1% agarose gel stained with 0.5 μ L/ml ethidium bromide using 1kb DNA ladder as molecular size marker.

Positive reactions were determined by the presence of bands of appropriate size (1500 base pair) and then the PCR products were purified by using QIAquick Gel Extraction (Qiagen, Hiden, Germany).

Purified PCR products were sequenced by using the ABI 3730 DNA Analyzer, with the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, California, EUA) using primer 533R (5' TKACCGCGGCTGCTG 3'). Sequences of approximately 600 bases were obtained, inspected and edited using the software BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html), and the identity/approximate phylogenetic position was obtained by comparison with 16S rRNA gene sequences of the GenBank database from National Center of Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov) through the basic local alignment search tool (BLAST).

Sequences with more than 4 ambiguous characters or shorter than 500 bases were discarded, and it was considered at least 98% similarity level (Ribeiro *et al.*, 2011).

Statistical Analysis

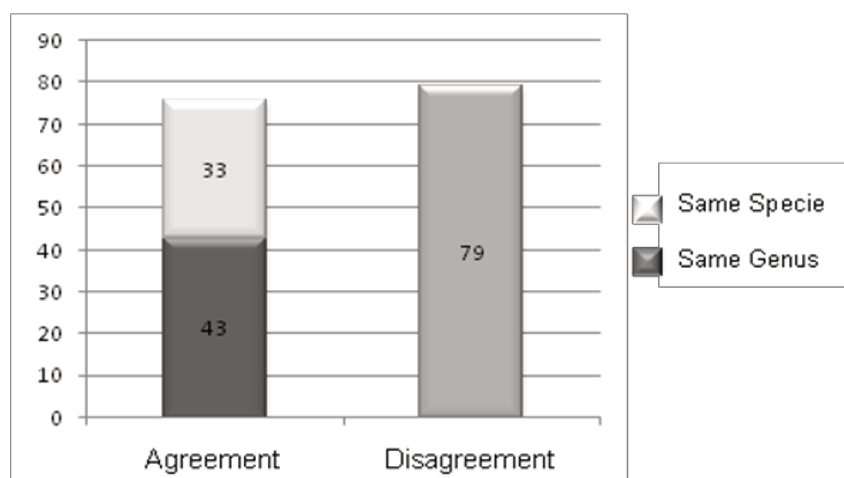
The statistical analysis were performed by using SPSS for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA). The Pearson chi-square or Fisher exact tests was chosen to determine whether there were significant agreement between biochemical and molecular identification. The significant level was set at 5%.

RESULTS

From a total of 220 bacteria isolated by culture, 155 strains were identified by biochemical tests and 215 by 16S rRNA gene sequencing. Sixty-five strains were no identified biochemically, however the 16S rRNA sequencing allowed the identification of 63 strains (97%). There was an agreement of 49% (76 strains) between these 2 methods of identification, 27.7% at genus level (43/155) and 21.3% at specie level (33/155). Seventy-nine samples showed different identification comparing biochemical and molecular methods (**Grafic 1**).

There was a significant agreement between the methods in the identification of *Prevotella buccae*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* and *Propionibacterium acnes* ($p < 0.05$; OR=2.500; IC=1.170-5.341).

Thirty-four different species were identified by biochemical methods and 57 by sequencing. Samples not identified by the biochemical tests (65/220), were present in 17 cases and included: *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Prevotella* spp, *Dialister* spp, *Campylobacter* spp, *Olsenella* spp., *Porphyromonas gingivalis* and others.



Graphic 1 – Number of samples with agreement and disagreement between biochemical identification and 16S rRNA sequencing.

Five strains not identified biochemically remained uncharacterized after sequencing because the sequence obtained were not adequate. They presented many ambiguous characters or a sequence length too short for comparison with those in the GenBank. Three of them were identified biochemically as *Parvimonas micra*, *Staphylococcus epidermides* and *Neisseria* sp., and the other 2 strains were also not identified biochemically.

The most frequently identified bacteria by biochemical tests were: *Prevotella* spp. (16/20), *Parvimonas micra* (10/20), *Gemella morbilorum* (7/20), *Bacteroides ureolyticus* (4/20), *Fingoldia magna* (4/20) e *Fusobacterium* spp. (4/20); and by sequencing: *Prevotella* spp. (16/10), *Pseudoramibacter alactolyticus* (9/20),

Parvimonas micra (6/20), *Dialister invisus* (6/20), *Filifactor alocis* (4/20), *Peptostreptococcus stomatis* (4/20) (**Graphic 4**).

The identification by biochemical methods of some species such as *Gemella morbillorum*, *Clostridium* spp., *Fingoldia magna*, *Bacteroides ureolyticus*, *Eggherthella lenta* and *Anaerococcus prevotii* were not confirmed by 16S rRNA sequencing, probably due to the misidentification of the biochemical methods. Some important endodontic pathogens such as *Dialister invisus*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Slackia exigua*, *Atopobium rimae* and *Olsenella uli* could only be characterized by 16S rRNA sequencing.

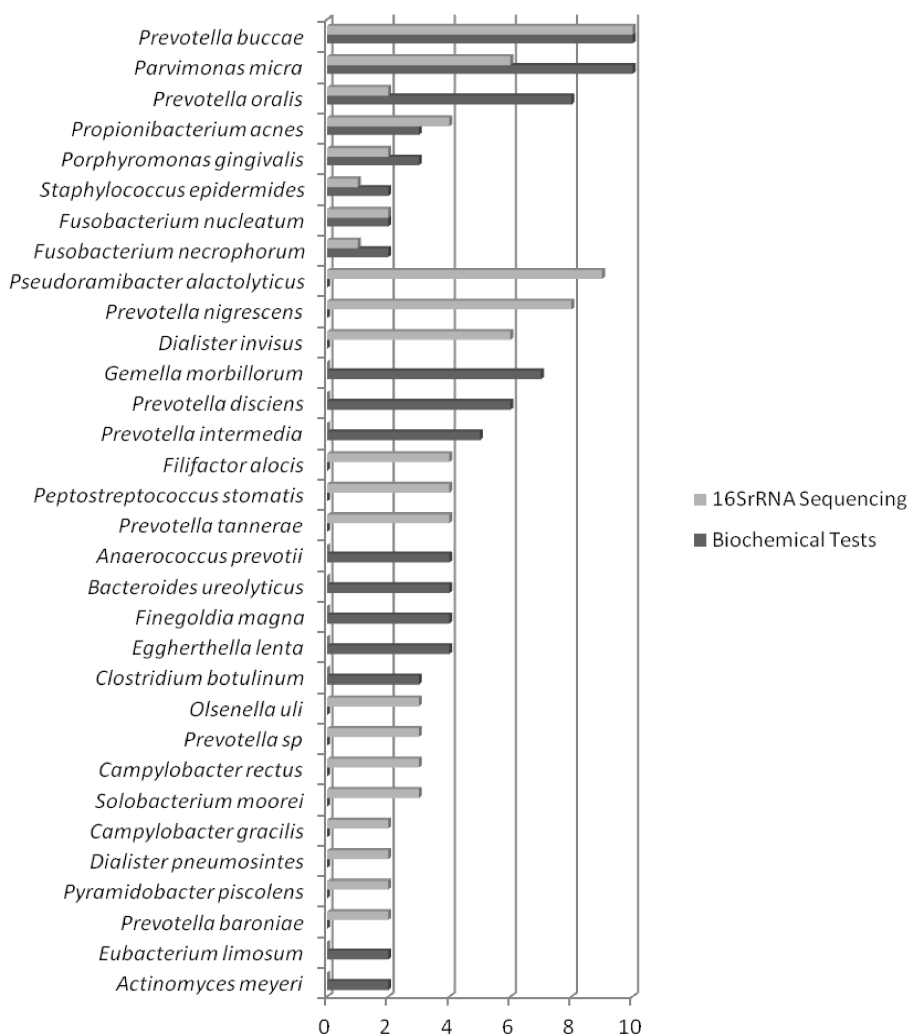


Figure 2 – Bacteria most frequently identified by 16S rRNA sequencing and biochemical methods.

DISCUSSION

Different microbial results might occur between laboratories in different countries. However, such differences clearly could reflect a different prevalence of species rather than different sampling or laboratory technique. The use of commercial kits for investigation supplemented by additional tests avoids many of the problems that give rise to inter-laboratory variation, non-standard conditions, and reagents. They also represent a reproducible and consistent analytic system available to relatively non-specialist laboratories, thus making endodontic microbial analysis more widely accessible. However, if they allow a wide range of microorganisms to be identified, such identification is dependent on continuous update of the kit's database, and other limitations do not allow an accurate bacterial identification (Gomes *et al.*, 1994; Petti *et al.*, 2005).

Conventional automated identification systems often rely on interpretations of a Gram stain morphology (e.i., RapID ANA) or oxidase result (e.g., Biolog) for selecting the correct reference database and seemingly simple biochemical or Gram reactions are not unquestionably foolproof and may lead to inappropriate use of comparative databases (Drancourt *et al.*, 2000; Petti *et al.*, 2005). Similar characteristics among some species isolated from human oral cavities, including colony morphology, Gram stain morphology, and fermentation patterns, represent limitations that not provide an accurate identifications of some strains (Alexander *et al.*, 1997; Bosshard *et al.*, 2004). Such exhaustive phenotypic testing potentially delays turnaround time without the added benefit of accuracy.

The rapid result from the microbiology laboratory is an interesting possibility of providing clinicians with a useful identification of infectious agents early enough to influence decisions about the diagnosis and initial treatment of the patient from whom the specimen was taken (Bascomb & Manafi, 1998).

16S rRNA sequencing approach was first proposed to identify uncultured bacteria, but it has also been recently used for identification of cultivable bacteria that shows atypical phenotypic behavior and cannot be accurately identified biochemically (Siqueira & Roças, 2005). The sequencing method used in

the present research required a DNA extracted from a pure culture, so the 5 strains that remained unidentified after sequencing was probably because they were not in a pure culture.

Our methodology enabled the isolation of 220 strains and the identification of 70,5% of isolated strains by biochemical methods and 97% by 16S rRNA sequencing. This result improves our knowledge on the primary endodontic infection and shows the limitations of biochemical identification methods, corroborating with the findings of Drancourt *et al.* (2000): conventional identification failed to produce accurate results in 76 isolates (58.7%), Gram staining in 16 isolates (11.6%), Gram-morphology, oxidase and catalase activity determination in five isolates (3.6%) and growth requirement determination in two isolates (1.5%). They reported that the overall performance of 16S rRNA sequence analysis was excellent and succeeded in identification of phenotypically unidentifiable bacterial isolates, what happened in this present research, where 63 out of 65 unidentified phenotypically isolates were identified by sequencing.

Petti *et al.* (2005) reported that 3 strains isolated from patients with endocarditis, and identified by conventional methods as *Facklamia* sp., *Eubacterium tenue*, and a *Bifidobacterium* sp., were identified as *Enterococcus faecalis*, *Cardiobacterium valvarum* and *Streptococcus mutans*, respectively by 16S rRNA gene sequencing.

In our results, there was an agreement of 49% (76 strains) between these 2 methods of identification, 27.7% at genus level (43/155) and 21.3% at specie level (33/155). Seventy-nine samples showed different identification comparing biochemical and molecular methods. Bosshard et al (2004), showing a similar result, identified phenotypically 67 (39%) isolates to the species level and 32 (19%) to the genus level. In comparison, 16S rRNA sequencing identified 138 (81%) isolates to the species level and 33 (19%) to the genus level. The identification of 42 out of 67 isolates assigned to a species with the API 20 Strep system, showed disagreement with genotypically molecular analyses.

Commercial kits are available, widely used and is generally accepted as a reliable identification system. However our results, corroborating with other in literature (Drancourt *et al.*, 2000; Broschard *et al.*, 2004; Petti *et al.*, 2005), demonstrate that identification by molecular analysis is superior to biochemical methods and should be implemented in the clinical laboratory.

Some species frequently associated with endodontic infection such as *Dialister invisus*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Slackia exigua*, *Atopobium rimae* and *Olsenella uli* could only be characterized by 16S rRNA sequencing. It is likely that many of these bacteria are hidden within culture collection, since the strains could not be differentiated from closely related species (Paster *et al.*, 2001), and on this way, the bacterial diversity is underestimated using biochemical identification alone.

On the other hand, *Prevotella* spp., *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra*, and *Propionibacterium acnes*, important endodontic pathogens, were identified biochemically as well as by sequencing in our study (Rolph *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2001a; Munson *et al.*, 2002; Dahlén *et al.*, 2002; Jacinto *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004, Viana *et al.*, 2005; 2008; Montagner *et al.*, 2010). The biochemical tests applied showed a great reliability in the identification of this species, with a statistically agreement between the both methods.

Considering the microbiological etiology of this disease, it is important to understand as much as possible the endodontic microbiota (Siqueira & Roças, 2009; Yang *et al.*, 2010). The control or elimination of microorganisms and possible substrate must be an objective in every endodontic case, and so there is still a place for microbiological studies, in order to improve our prognosis and lead to the development of rational treatment strategies. Our study highlights the need for clinical microbiology laboratories to have molecular methods to supplement the routine phenotypic identification of bacterial isolates, as suggested by Drancourt *et al.*, (2000). Molecular methods showed that endodontic microbiota was underestimated by biochemical identification studies.

It was concluded that 16S rRNA sequencing can offer a more consistently reliable and accurate method for bacterial identification, allowing the characterization of biochemically unidentified strains.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors deny any conflicts of interest. This study was supported by the Brazilian Agencies FAPESP (2009/07760-5 & 2011/09047-4) and CNPQ (302575/2009). We would like to thank to Pâmela Pontes and Tiago Pereira da Rosa for technical support.

REFERENCES

- 1- Alexander CJ, Citron DM, Gerardo SH, Claros MC, Talan D, Goldstein EJC. Characterization of saccharolytic bacteroides and prevotella isolates from infected dog and cat bite wounds in humans. J Clin Microbiol. 1997; 35: 406-11
- 2- Bascomb S, Manafi M. Use of enzyme tests in characterization and identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. Clin Microbiol Rev. 1998; 11:318-40.
- 3- Bosshard PP, Abels S, Altwegg M, Bottger EC, Zbinden R. Comparison of conventional and molecular methods for identification of aerobic catalase-negative Gram-positive cocci in the clinical laboratory. J Clin Microbiol. 2004; 42: 2065-73.
- 4- Brook I, Grimm S, Kielich RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. Journal of Endodontics. 1981; 7: 378-80.
- 5- Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2004; 17: 840-62.
- 6- Chan ECS, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. Oral Microbiol Immunol. 2000; 15: 1-9.

- 7- Dahlén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol* 2000. 2002; 28(1): 206-39.
- 8- Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, Raoult D. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol*. 2000; 38: 3623-30.
- 9- Ferreira AM, Bonesso MF, Mondelli AL, Cunha MLRS. Identification of *Staphylococcus saprophyticus* isolated from patients with urinary tract infection using a simple set of biochemical tests correlating with 16S–23S interspace region molecular weight patterns. *J Microbiol Methods*. 2012; 91: 406-11.
- 10- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J*. 1994; 27: 291-8.
- 11- Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA *et al*. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19: 71-6.
- 12- Gomes BPA; Jacinto RC; Montagner F; Sousa ELR; Ferraz CCR. Analysis of the Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria Isolated from Endodontic Infections in Brazil during a Period of Nine Years. *J Endod*. 2011; 37: 1058-62.
- 13- Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria *Oral Microbiol Immunol*. 2003; 18: 285-92.
- 14- Montagner F, Gomes BP, Kumar PS. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *J Endod*. 2010; 36: 1475-9.
- 15- Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res*. 2002; 81: 761-6.

- 16- Patel JB. 16SrRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis*. 2001; 6(4): 313-21.
- 17- Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology* 2001; 183: 3770-3783.
- 18- Petti CA, Polage CR, Schreckenberger P. The Role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. *J Clin Microbiol*. 2005; 43: 6123-5.
- 19- Ribeiro AC, Matarazzo F, Faveri M, Zezell DM, Mayer MPA. Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *J Endod*. 2011; 37: 922-6.
- 20- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L *et al*. Molecular identification of Microorganisms from endodontic infection. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 3282-9.
- 21- Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21: 112-22.
- 22- Schirrmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E *et al*. New bacterial composition in root-filled teeth with periradicular lesion. *J Endod*. 2009; 35: 169-74.
- 23- Shah HN, Gharbia SE. Studies on the physiology and ecology of black-pigmented Gram-negative anaerobes which may be important in disease development. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1993; 6: 165-72.
- 24- Siqueira JF, Roças IN, Paiva SSM, Magalhães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canal as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22: 266-71.

- 25- Siqueira JF, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1—current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005; 31: 411-23.
- 26- Siqueira JF, Roças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009; 88: 61-5.
- 27- Siqueira Jr JF, Roças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-direct polymerase chain reaction. *J Endod.* 2001; 27: 164-7.
- 28- Torabinejad M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology.* 1994; 78: 511-21.
- 29- Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JL. The Human Microbiome Project. *Nature.* 2007; 449: 804-10.
- 30- Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20: 253-8.
- 31- Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol.* 2008; 23: 282-90.
- 32- Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 110-8.
- 33- Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 394: 731-42.
- 34- Yang QB, Fan LN, Shi Q. Polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis, cloning, and sequencing analysis of bacteria associated with acute periapical abscesses in children. *J Endod.* 2010; 36: 218-23.

5- CONSIDERAÇÕES GERAIS

5.1 – DIVERSIDADE MICROBIOTA

Diante dos resultados encontrados neste estudo e do levantamento bibliográfico realizado constata-se uma expressiva diversidade da microbiota endodôntica, caracterizada pelo predomínio de bactérias anaeróbias gram-negativas e pela significativa presença de microrganismos ainda não cultiváveis.

Pela técnica de cultura microbiológica foram isoladas 220 cepas, das quais 155 foram identificadas por métodos bioquímicos, num total de 34 espécies diferentes. Bactérias importantes para as infecções endodônticas, como *Prevotellas* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra*, foram isoladas por métodos de cultura e identificadas bioquimicamente. Outras espécies encontradas com frequência foram *Gemella morbilorum*, *Finegoldia magna*, *Eggherthella lenta*, *Bacteroides ureolyticus*, *Anaerococcus prevotii*.

Pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, 215 cepas foram identificadas, quase 30% a mais que a identificação fenotípica, totalizando 57 espécies diferentes, dentre elas *Prevotella* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., entre outras.

Prevotella spp. e *Porphyromonas* spp. são espécies anaeróbias gram-negativas produtoras de pigmento negro, frequentemente isoladas de infecções endodônticas primárias (Jacinto *et al.*, 2007). *F. nucleatum*, anaeróbio gram-negativo, tem sido associada com *flare-ups* (Villanueva, 2002) e infecções endodônticas sintomáticas (Sakamoto *et al.*, 2006) e demonstraram causar um aumento na patogenicidade de outros microrganismos em culturas mistas, especialmente *P. gingivalis* e *P. intermedia* (Baumgartner *et al.*, 1999). *P. micra*, um coco anaeróbio gram-positivo, tem sido associado com abscessos odontogênicos agudos (Sousa *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2004; 2008).

Algumas espécies identificadas fenotipicamente não tiveram sua identidade confirmada pelo sequenciamento, mostrando uma limitação e identificação errônea do método bioquímico. Entre essas temos *Gemella morbilorum*, *Clostridium* spp., *Finnegoldia magna*, *Bacteroides ureolyticus*, *Eggherthella lenta* e *Anaerococcus prevotii*.

Patógenos importantes e frequentemente associados com infecções endodônticas foram caracterizados apenas genotipicamente. São espécies bacterianas difíceis de cultivar, fastidiosas ou cepas com comportamento fenotípico atípico, não podendo ser identificadas fielmente por métodos bioquímicos, tais como *Dialister invisus*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Slackia exigua*, *Atopobium rimae* and *Olsenella uli*. (Jung *et al.*, 2001; Siqueira *et al.*, 2001b; Vianna *et al.*, 2005; Foshi *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2006; Weile e Knabbe, 2009).

Pela técnica da clonagem bacteriana foram identificados 76 filotipos diferentes, sendo que espécies muito difíceis de serem cultivadas tais como *Dialister* spp. *Tanerella forsythia*, *Shuttleworthia satelles* e *Filifactor alocis* foram frequentemente detectadas.

Olsenella spp. têm sido comumente associadas com infecções da cavidade oral (Dewhirst *et al.*, 2010; Roças *et al.*, 2005). *Olsenella profusa* é um anaeróbio estrito, não formador de esporos, sem motilidade, bacilo gram-positivo. Estudos prévios detectaram a presença desta espécie em infecções endodônticas em associação com *Olsenella uli* (Fouad *et al.*, 2002, Roças & Siqueira, 2005). Análise molecular e de cultura de amostras de canais radiculares infectados revelaram a ocorrência de *O. uli* em três dos cinco casos e *O. profusa* em um dos cinco casos (Munson *et al.*, 2002). No presente estudo, utilizando cultura, sequenciamento e clonagem, tanto *O. profusa* quanto *O. uli* foram encontradas.

Dialister spp., um cocobacilo gram-negativo anaeróbio, não fermentativo, não formador de esporos frequentemente associado com infecções purulentas, tem sido considerada um patógeno das infecções endodônticas (Siqueira *et al.*, 2004; Munson *et al.*, 2002; Paster *et al.*, 2001). Saito *et al.* (2006)

detectaram *Dialister invisus*, em 5 das 7 amostras endodônticas usando técnicas clonagem e sequenciamento. Neste estudo *Dialister invisus* foi encontrada em 9 casos e *Dialister pneumosintes* em 3 casos.

Shuttleworthia satelles é um bacilo, anaeróbio estrito, não formador de esporos, sem motilidade, gram-positivo. Foi originalmente isolado da placa subgingival humana e bolsas periodontais de pacientes com periodontite como descrito por Downes *et al.* (2002). Neste estudo, *S. satelles* foi isolado em apenas um caso, resultado semelhante foi encontrado por Jacinto *et al.*, 2007 e Ribeiro *et al.*, 2011.

Treponema spp., espécies relacionadas com periodontites, também vêm se mostrando frequente em infecções endodônticas (Siqueira *et al.*, 2001a; Gomes *et al.*, 2006a; Sakamoto *et al.*, 2006; Montagner *et al.*, 2010b). São bactérias extremamente difíceis de cultivar e em nosso estudo, apenas 2 caso apresentou clones identificados como *Treponema denticola* e *Treponema socranskii*.

E. faecalis tem sido amplamente associado com insucesso do tratamento endodôntico tanto por cultura (Pinheiro *et al.*, 2003) quanto por métodos moleculares (Roças *et al.*, 2004). Contudo, Gomes *et al.* (2006b) usando PCR detectaram esta espécie em alta frequência em infecções endodônticas primárias. No presente estudo, onde apenas infecções endodônticas primárias sintomáticas foram investigadas por cultura, clonagem e seqüenciamento, *E. faecalis* foi detectado em dois casos.

Muitos filotipos incultiváveis foram detectados e assim como algumas novas espécies que vêm sendo relacionadas com infecções endodônticas, como por exemplo *Catonella morbi*, uma bactéria anaeróbia gram-negativa, sacarolítica já associada com problemas periodontais. Tal bactéria também foi detectada em infecções endodônticas por Siqueira & Roças, 2006.

No nosso trabalho observamos que através da clonagem e sequenciamento do 16S rRNA foi possível identificar em média 15 filotipos diferentes por canal, enquanto que pelo método cultura-dependente, a média de

espécies diferentes por canal foi de 6. A literatura mostra que são encontrados cerca de 3 a 5 espécies por canal radicular, em caso de infecção endodôntica primária, utilizando-se métodos cultura-dependente (Gomes *et al.*, 2004; Siqueira *et al.*, 2007). Já através de métodos moleculares, este número varia de 7 a 20 (Sakamoto *et al.*, 2006; Siqueira *et al.*, 2007).

Não existe um método capaz de identificar todos os microrganismos encontrados nos diferentes tipos de infecções endodônticas. Avanços tecnológicos têm permitido a superação de determinadas limitações das metodologias (Paster *et al.*, 2001; Siqueira & Roças, 2005; Sakamoto *et al.*, 2006; Sassone *et al.*, 2009; Schirrmeister *et al.*, 2009; Yang *et al.* 2010), e um aspecto bastante importante é a associação de metodologias para o estudo da microbiota endodôntica, o que permite um conhecimento mais acurado desse complexo ecossistema microbiano (Gomes *et al.*, 2006b; Gomes *et al.*, 2008).

5.2 - METODOLOGIAS

Para avaliação de diversidade da microbiota os métodos mais indicados são os que envolvem técnicas de biologia molecular. Entretanto, apesar das limitações dos métodos cultura-dependentes, estes ainda representam uma valiosa ferramenta para a microbiologia clínica. O cultivo de microrganismos em laboratório a partir de amostras clínicas apresenta vantagens como permitir o crescimento de diversas espécies, sem procurar por bactérias específicas; fornecer cepas para a realização de testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (Siqueira & Roças, 2005) e permitir o estudo da fisiologia e da patogenicidade microbiana (Shah & Gharbia, 1993).

Os métodos de identificação bioquímica ou cultura dependente, baseados em informações fenotípicas, requerem controle rígido de diversas variáveis técnicas, e de forma geral limitam a investigação da diversidade microbiológica. A reprodução de condições nutricionais e ambientais (requerimento gasoso e temperatura) adequadas para o crescimento de algumas

espécies fastidiosas nem sempre é obtida com sucesso. A própria interpretação dos testes bioquímicos pode envolver caráter subjetivo. Além disso, algumas bactérias apresentam comportamento atípico e espécies recentemente descritas podem demorar a ser incluídas nos bancos de dados dos testes bioquímicos (Drancourt *et al.*, 2000). Isso tudo provavelmente leva a uma identificação incorreta de isolados clínicos. Com os avanços tecnológicos disponíveis e aplicação de métodos que possibilitam a identificação genotípica de isolados microbianos, percebe-se que a microbiota oral e endodôntica é ainda mais complexa do que descrita por estudos anteriores (Siqueira & Roças, 2005; Vickerman *et al.*, 2007; Siqueira *et al.*, 2007).

O sequenciamento do gene 16S rRNA é uma importante ferramenta nos estudos de microbiologia e identificação bacteriana. Inicialmente foi proposto para estudar e identificar bactérias não-cultiváveis. Atualmente o sequenciamento permite uma identificação fiel de bactérias que são raras ou que apresentam características fenotípicas atípicas, e até mesmo de bactérias que ainda não foram cultiváveis (Munson *et al.*, 2002; Clarridge, 2004; Siqueira *et al.*, 2005; Vickerman *et al.*, 2007). Assim temos uma melhor entendimento dessa microbiota, fato observado no presente estudo, pois das 65 amostras (30%) não identificadas por métodos bioquímicos, 97% foram identificadas após o sequenciamento.

Sabe-se que o comprimento do gene 16S rRNA é de aproximadamente 1550 bp, porém, os 500 bp iniciais são suficientes para identificar a maioria dos isolados clínicos (Clarridge, 2004). Por isso optamos por utilizar o primer 533R para o sequenciamento dos clones, o que resultou em sequências de aproximadamente 500bp.

Considerando que as espécies que cresceram por cultura correspondem às espécies cultiváveis provavelmente presentes em maior número no canal radicular, e que o número de bactérias e seus respectivos fatores de virulência estão diretamente relacionados com os danos causados ao hospedeiro, a associação da cultura microbiológica com o sequenciamento possibilitou uma

identificação fiel de bactérias realmente significantes para os casos de infecções endodônticas estudados.

A análise clonal vem sendo bastante utilizada em estudos de diversidade ou metagenômicos, pois assim como outros métodos moleculares apresenta uma alta sensibilidade, confiabilidade e permite identificação de bactérias raramente encontradas e até mesmo as não-cultiváveis até o momento (Fouad *et al.*, 2002; Siqueira & Roças, 2005; Vickerman *et al.*, 2007; Siqueira *et al.*, 2007; Jacinto *et al.*, 2007). Na técnica da clonagem não procuramos por bactérias específicas, o que permite uma avaliação mais geral do perfil microbiológico de determinada infecção. No entanto, um grande número de clones precisa ser sequenciado para atingir este propósito, o que é logisticamente difícil de conseguir quando se tem um número muito grande de amostras. Desta forma, técnicas auxiliares como a de cromatografia líquida de alto desempenho com desnaturação (DHPLC) (Jacinto *et al.*, 2007) e análise de fragmentos cortados por enzimas de restrição (Rolph *et al.*, 2001) podem fazer uma avaliação prévia dos produtos da reação amplificada com o objetivo de reduzir o número de clones a serem avaliados. Assim, evitam-se repetições do procedimento de caracterização para sequências de DNA com perfis semelhantes, que podem corresponder a um mesmo clone.

Jacinto *et al.* (2007) empregaram a clonagem juntamente com a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho com desnaturação (DHPLC) para verificar a diversidade da microbiota presente em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa. Os autores demonstraram a alta incidência do microrganismo *Olsenella profusa*, além da presença de *Porphyromonas gingivalis*, *Dialister pneumosintes*, *Dialister invisus*, *Lachnospiraceae* oral clone, *Staphylococcus aureus*, *Pseudoramibacter alactolyticus* e *Parvimonas micra*. Foram encontrados também anaeróbios facultativos isolados frequentemente tais como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus anginosus* e *Lactobacillus* spp. O estudo demonstrou uma grande

diversidade de espécies que são capazes de compor a microbiota dos canais radiculares, incluindo bactérias incultiváveis.

Ao analisar o dendrograma construído a partir de sequências obtidas no presente estudo, verificamos que algumas das bactérias classificadas como incultiváveis apresentaram uma similaridade filogenética com outras espécies. Trabalhos futuros visam realizar o sequenciamento de um fragmento maior do gene 16S dessas amostras, para podermos alinhá-lo com o gene 16S de bactérias já conhecidas e então poder classificar tais bactérias corretamente. Segundo Clarridge (2004), algumas espécies em particular requerem o sequenciamento de todo o gene 16S r RNA para serem diferenciadas. Obtendo a sequência de todo fragmento do 16S rRNA iremos poder confirmar a presença ou não de uma nova espécie ainda desconhecida.

O desenvolvimento das técnicas moleculares de identificação microbiana realmente favoreceu o diagnóstico e expandiu o conhecimento da composição da microbiota oral. Com certeza novos microrganismos ainda serão identificados. Entretanto fica o desafio em meio à detecção de tantas espécies, de saber qual a importância e as implicações clínicas destes achados laboratoriais (Gomes & Montagner, 2010).

É importante ressaltar que a maioria das metodologias moleculares informa apenas a presença ou ausência de determinadas bactérias. Devemos atentar para a interpretação dessas informações, pois o número de células encontradas pode ser significativo em relação ao papel de cada espécie na etiopatogênia das alterações pulpares e periapicais. Algumas bactérias podem representar apenas um papel ecológico enquanto outras estão diretamente ligadas aos danos causados ao hospedeiro (Gomes *et al.*, 2006b; Gomes *et al.*, 2008). Essa questão deve ser esclarecida por futuros estudos, assim como a tentativa de identificação das bactérias consideradas incultiváveis até o momento.

As espécies detectadas neste presente estudo provavelmente representam patógenos endodônticos que realmente exercem um papel importante nos casos de abscesso agudos estudados. Embora haja a

possibilidade de detecção de DNA de células bacterianas mortas, é pouco provável que este permaneça íntegro no ambiente extra-celular colonizado por outros microrganismos vivos. Dnases liberadas por espécies sobreviventes, ou até mesmo devido à morte celular, degradam o DNA livre no ambiente (Siqueira & Roças, 2005). Além disso, foi utilizado primers que geram fragmentos longos noPCR universal, o que reduz os riscos de detecção de células mortas. Isto porque para haver a amplificação desse fragmento longo, o DNA precisa estar íntegro. Entretanto, a clonagem e sequenciamento não quantificam nem determinam viabilidade bacteriana, o que só é possível através de metodologias para a detecção de mRNA por meio de RT-PCR.

De qualquer maneira, as interações bacterianas parecem ser o elemento chave para o crescimento e a sobrevivência dos microrganismos no seu habitat e consequente capacidade de produzir doença. Além disso, a complexidade do sistema de canais radiculares favorece o surgimento de uma comunidade microbiana bastante diversificada. As técnicas de coleta e processamento laboratorial, tanto de cultivo quanto moleculares, apresentam limitações intrínsecas. Para um diagnóstico ideal seria necessário o uso conjunto de metodologias que fornecem resultados de detecção, caracterização e quantificação para desenhar de forma mais completa o perfil das comunidades microbianas relacionadas às infecções endodônticas em suas diversas modalidades: infecções primárias sintomáticas e assintomáticas, infecções secundárias e persistentes (Jung *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2008; Gomes & Montagner, 2010).

Trabalhos estão em andamento, agregando outras metodologias moleculares no intuito de determinar a diversidade bacteriana presente nestas infecções endodônticas. Além disso, será realizado o sequenciamento de toda extensão do gene 16S rRNA (1500 pares de base) de alguns clones que mostraram um posicionamento filogenético no dendrogramas sugestivo de bactérias ainda não identificadas.

6- CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos com as metodologias utilizadas, podemos concluir que:

- 1- Métodos cultura-dependentes e de identificação fenotípica podem subestimar a diversidade da microbiota endodôntica.
- 2- A clonagem bacteriana e sequenciamento do gene 16S rRNA revelou uma grande diversidade bacteriana nos casos de dentes com abscesso periapical agudo.
- 3- Associação de metodologias (identificação bioquímica e molecular) permite um conhecimento mais acurado da complexa microbiota presente em casos de infecções endodônticas primárias agudas.
- 4- Canais radiculares de dentes com abscesso apical agudo apresentam microbiota heterogênea, com predomínio de espécies anaeróbias Gram-negativas, pertencentes principalmente aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*.

7- REFERÊNCIAS*

- 1- Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae K-S, Xia T. Association of black pigmented bacteria with endodontic infections. J Endod. 1999; 25(6): 413-5.
- 2- Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of candida albicans in infection of endodontic origin. J Endod. 2000; 26(12): 695-8.
- 3- Baumgartner JC, Lhemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. J Endod. 2003; 29(12): 794-7.
- 4- Brook I, Grimm S, Kielich RB. Bacteriology of acute periapical abscess in children. Journal of Endodontics. 1981; 7(8): 378-80.
- 5- Chan ECS, McLaughlin R. Taxonomy and virulence of oral spirochetes. Oral Microbiol Immunol. 2000; 15(1): 1-9.
- 6- Chen V, Chen Y, Li H, Kent K. Herpesviruses in Abscesses and cellulitis of endodontic origin. J Endod. 2009; 35(2): 182-8.
- 7- Clarridge JE 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacterial on clinical microbiology and infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 2004; 17(4): 840-62.
- 8- Dahlén G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. Periodontol 2000. 2002; 28(1): 206-39.
- 9- Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH, Lakshmanan A *et al.* The human oral microbiome. J Bacteriol. 2010; 192(19): 5002-17.
- 10-Downes J, Munson MA, Radford DR, Spratt DA, Wade WG. *Shuttleworthia satelles* gen. nov., sp. nov., isolated from the human oral cavity. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52(5): 1469-75.
- 11-Drancourt M, Bollet C, Carlioz A, Martelin R, Gayral JP, RaoultD. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. J Clin Microbiol. 2000; 38(10): 3623-30.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- 12-Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, sambri V, Patri C. Detection of bacteria in endodontic sample by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol.* 2005; 20(5): 289-95.
- 13-Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(9): 3223-31.
- 14-Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27(6): 291-8.
- 15-Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(2): 71-6.
- 16-Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa ELR, Zaia AA, Ferraz CCR et al. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failure endodontic treatment. *J Endod.* 2006a; 32(10): 937-40.
- 17-Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detect by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006b; 102 (2): 247-53.
- 18-Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008; 34(5): 537-40.
- 19-Gomes BPFA, Montagner F. O papel do diagnóstico molecular no estudo das infecções de origem endodôntica: conceitos, técnicas e aplicações. In: Ferrari PHP, Bombana AC. *A Infecção Endodôntica e sua Resolução.* 1 ed. São Paulo: Santos; 2010. p. 23-45.
- 20-Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(5): 285-92.
- 21-Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendran D, Shah HN. Bacterial examination

- of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22(6): 403-10.
- 22-Jung IY, Choi BK, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 92(3): 329-34.
- 23-Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1965; 20: 340-9.
- 24-Li H, Chen V, Chen Y, Baumgartner JC, Machida CA. Herpesviruses in endodontic pathoses: association of Epstein-Barr virus with irreversible pulpitis and apical periodontitis. *J Endod*. 2009; 35(1): 23-9.
- 25-Li L, Hsiao WWL, Nandakumar R, Barbuto SM, Mongoidn EF, Paster BJ, Fraser-Liggett CM, Fouad AF. Analyzing endodontic infection by deep coverage pyrosequencing. *J Dent Res*. 2010; 89(9): 980-4.
- 26-Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE2 production *J Endod*. 2011; 37(5): 602-7.
- 27-Montagner F. Identificação microbiológica em dentes com necrose pulpar e abscessos periapicais e a suscetibilidade antimicrobiana de algumas bactérias anaeróbias isoladas [dissertação]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2009.
- 28-Montagner F. Comunidades microbianas em canais radiculares e abscessos periapicais agudos e suscetibilidade de algumas bactérias anaeróbias estritas isoladas [tese]. Piracicaba: UNICAMP/FOP; 2010.
- 29-Montagner F, Gomes BP, Kumar PS. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *J Endod*. 2010a; 36(9): 1475-9.
- 30-Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Gomes BPFA. Treponema species detected in infected root canals and acute apical abscess exudate. *J Endod*. 2010b; 36(11): 1796-9.

- 31-Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Sanches PF, Gomes BPFA. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infection. *J Endod.* 2012; 38(2): 158-62.
- 32-Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002; 81(11): 761-6.
- 33-Ozok AR, Persoon IF, Huse SM, Keijser BJF, Wesselink PR, Crielaard W et al. Ecology of the microbiome of the infected root canal system: a comparison between apical and coronal root segments. *Int Endod J.* 2012; 45(6): 530-41.
- 34-Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of Bacteriology.* 2001; 183(12): 3770-3783.
- 35-Patel JB. 16SrRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis.* 2001; 6(4): 313-21.
- 36-Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003; 36(1): 1-11.
- 37-Ribeiro AC, Matarazzo F, Faveri M, Zezell DM, Mayer MPA. Exploring bacterial diversity of endodontic microbiota by cloning and sequencing 16S rRNA. *J Endod.* 2011; 37(7): 922-6.
- 38-Riggio MP, Aga H, Murray CA, Jackson MS, Lennon A, Hammersley N, Bagg J. Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Sur Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103(5): 610-7.
- 39-Roças IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004; 30(5): 315-20.
- 40-Roças IN, Siqueira JF. Species-directed 16S rRNA gene nested PCR detection of *Olsenella* species in association with endodontic diseases. *Lett Appl Microbiol.* 2005; 41(1): 12-6.

- 41-Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L et al. Molecular identification of Microorganisms from endodontic infection. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(9): 3282-9.
- 42-Sabeti M, Simon JH, Nowzari H, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr vírus active infection in Periapical lesiono f teeth with intact crowns. *J Endod.* 2003; 29(5): 321-3.
- 43-Sabeti M, Kermani V, Sabeti S, Simon JH. Significance of Human Citomegalovirus and Epstein-Barr virus in inducing cytokine expression in periapical lesion. *J Endod.* 2012; 38(1): 47-50.
- 44-Saito D, Leonardo RT, Rodrigues JL, Tsai SM, Hofling JF, Goncalves RB. Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries. *J Med Microbiol.* 2006; 55(1): 101-7.
- 45-Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(2): 112-22.
- 46-Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra F, Figueiredo L, Fidel SR et al. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infection. *J Endod.* 2008; 34(5): 541-5.
- 47-Schirrmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E et al. New bacterial composition in root-filled teeth with periradicular lesion. *J Endod.* 2009; 35(2): 169-74.
- 48-Shah HN, Gharbia SE. Studies on the physiology and ecology of black-pigmented Gram-negative anaerobes which may be important in disease development. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1993; 6(2-3): 165-72.
- 49-Siqueira JF, Rocas IN. Simultaneous detection of *Dialister pneumosintes* and *Filifactor alocis* in endodontic infection by 16S rDNA-direct multiplex PCR. *J Endod.* 2004; 30(12): 851-4.
- 50-Siqueira JF, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1 - current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005; 31(6): 411-23.

- 51-Siqueira JF, Roças IN. *Catonella morbi* and *Granulicatella adiacens*: new species in endodontic infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(2): 259-64.
- 52-Siqueira JF, Roças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res.* 2009a; 88(11): 969-81.
- 53-Siqueira JF, Roças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res.* 2009b; 88(1): 61-5.
- 54-Siqueira Jr JF, Roças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Detection of putative oral pathogens in acute periradicular abscesses by 16S rDNA-direct polymerase chain reaction. *J Endod.* 2001a; 27(3): 164-7.
- 55-Siqueira Jr JF, Roças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod.* 2001b; 27(9): 563-6.
- 56-Siqueira JF, Rocas IN, Uzeda M, Colombo AP, Santos KR. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. *J Med Microbiol.* 2002; 51(12): 1090-6.
- 57-Siqueira JF Jr, Rocas IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(6): 363-70.
- 58-Siqueira JF, Roças IN, Cunha CD, Rosado AS. Novel bacterial phylotypes in endodontic infections. *J Dent Res.* 2005; 84(6): 565-9.
- 59-Siqueira JF, Roças IN, Paiva SSM, Magalhães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canal as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol.* 2007; 22(4): 266-71.
- 60-Sousa ELR, Ferraz CCR, Gomes BP, Pinheiro ET, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(3): 332-9.
- 61-Sundqvist G, Johansson E, Sjören U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod.* 1989; 15(1): 13-19.

- 62-Torabinejad M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*. 1994; 78(4): 511-21.
- 63-Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JL. The Human Microbiome Project. *Nature*. 2007; 449(18): 804-10.
- 64-Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20(4): 253-8.
- 65-Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. Identification and quantification of Archaea involved in primary endodontic infection. *J Clin Microb*. 2006; 44(4): 1274-82.
- 66-Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BPFA. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol*. 2008; 23(4): 282-90.
- 67-Vianna ME, Conrads G, Gomes BPFA, Horz HP. T-RFLP-based mcrA gene analysis of methanogenic archaea in association with oral infections and evidence of a novel *Methanobrevibacter* phylotype. *Oral Microbiol Immunol*. 2009; 24(5): 417-22.
- 68-Vickerman MM, Brossard KA, Funk DB, Jesionowski AM, Gill SR. Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections. *J Med Microbiol*. 2007; 56(1): 110-8.
- 69-Villanueva LECP. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(2): 179-83.
- 70-Weile J, Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem*. 2009; 394(3): 731-42.
- 71-Yang QB, Fan LN, Shi Q. Polymerase chain reaction – denaturing gradient gel electrophoresis, cloning, and sequencing analysis of bacteria associated with acute periapical abscesses in children. *J Endod*. 2010; 36(2): 218-23.

APÊNDICE

1- DETALHAMENTO DA METODOLOGIA

Para este estudo foram utilizadas amostras microbiológicas pertencentes ao Banco de Coletas Clínicas do Laboratório de Microbiologia aplicada a Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP. Todas as amostras estudadas foram coletadas de canais radiculares de dentes com necrose pulpar, sintomatologia dolorosa e alteração periapical visível radiograficamente, e estavam armazenadas em freezer -80°C. Os critérios para seleção de pacientes, procedimentos de coleta, isolamento bacteriano e identificação fenotípica (testes bioquímico) foram descritos previamente por Montagner, 2009. A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (**Anexo I**).

Bactérias isoladas de 20 casos por métodos de cultura microbiológica e identificadas fenotipicamente, num total de 220 cepas, foram utilizadas para identificação genotípica através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Além disso, 10 coletas iniciais foram utilizadas para um estudo metagenômico através da clonagem bacteriana.

1.1 – IDENTIFICAÇÕES GENOTÍPICA DE BACTERIAS ISOLADAS POR CULTURA MICROBIOLÓGICA

1.1.1 - Extração de DNA bacteriano

Bactérias previamente cultivadas e isoladas em culturas puras (220 amostras), foram removidas das placas de meios de cultura, re-suspendidas em tubos de eppendorff contendo 400 ul de água MiliQ estéril, e armazenadas à -80°C (Banco de Coletas Clínicas do Laboratório de Microbiologia Endodôntica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP). O DNA dos microrganismos isolados de 20 casos foi então extraído através de um kit de extração chamado “QIAamp DNA mini kit” (QIAGEN, Hilden, Alemanha) (**Figura**

1), de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante. Este kit é específico para essa função e compreende uma série de tampões, centrifugações e filtrações para que o material genético seja extraído e no final re-suspenso em uma solução eluente para que possa ser armazenado a 20°C negativos. Após extração, a concentração do DNA de cada amostra foi quantificada através do espectrofotômetro para ácidos nucleicos NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA).



Figura 1– Remoção de bactérias do meio de cultura para extração do DNA; Kit de extração de DNA “QIAamp DNA mini kit” (QIAGEN)

1.1.2 - Amplificação do gene 16S rRNA - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do gene 16S rRNA é um procedimento necessário para a identificação genotípica dos microrganismos isolados, através do Sequenciamento genético.

Realizou-se então a PCR no termociclador GenePro Thermal Cycler (Bioer Technology, Hangzhou, China) para amplificação da região do gene 16S rRNA com os primers universais para procariontes do domínio Bactéria proposto por Paster *et al.* (2001):

Univ Forward 5' GAG AGT TTG ATY MTG GCT CAG 3'

Univ Reverse 5' GAA GGA GGT GWT CCA RCC GCA 3'

A reação foi realizada empregando-se uma mistura com volume total de 50µL, sendo 13µL referentes ao mix de reagentes. A quantidade de DNA e água

MiliQ estéril usada na reação variou de acordo com a concentração de DNA extraído de cada amostra. A concentração de DNA utilizada na reação foi de aproximadamente 100 ng/μL (Siquerira *et al.*, 2001; Viana *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2010). Das amostras bem concentradas foi utilizada uma pequena quantidade de DNA extraído (1 ou 2 μL), já das amostras pouco concentradas foi utilizado uma quantidade maior de DNA extraído (5 ou 10 μL). A quantidade de DNA e água deve somar um total de 37 μL, que somados com 13 μL do mix resulta no volume total da reação de 50 μL. O mix de reagentes era composto por 5μL de Buffer 10X PCR; 1,5μL de Cloreto de Magnésio; 4μL de dNTP; 1 μL Primer Univ F (25 pmol); 1 μL Primer Univ R (25 pMol); 0,5μL de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Life Technologies, Carlsbad, California, EUA). Os parâmetros do ciclo para amplificação incluíram uma pré-desnaturação por 4 minutos a 94°C, seguida por 30 ciclos com desnaturação a 94°C por 45 segundos + anelamento a 60°C por 45 segundos + extensão a 72°C por 1,5 minutos, e concluindo-se com uma extensão final a 72°C por 15 minutos (Ribeiro *et al.*, 2011).

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, por aproximadamente 45 minutos a 90V e temperatura ambiente em tampão TAE 1X (Tris Acetato EDTA). Foi usado marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen®) já que a reação resultou em um produto com 1500 pares de base. Após a eletroforese, o gel era observado sob luz UV e a imagem era então fotografada e gravada (**Figura 2**). As reações foram consideradas positivas se bandas do tamanho apropriado estivessem presentes (1500 pares de base). Foi utilizado um controle positivo com DNA extraído de uma bactéria padrão ATCC, para comprovar se a reação estava realmente correta, e um controle negativo, onde não era acrescentado DNA bacteriano, para verificar se não havia contaminação em nenhum dos reagentes ou na água MiliQ utilizada.

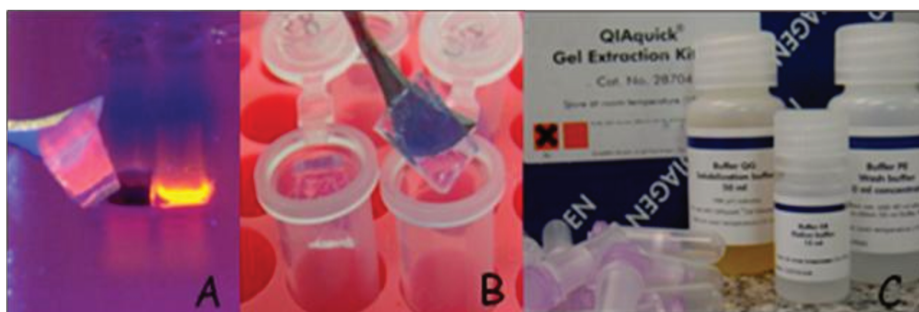


Figura 3 – Remoção da banda no gel de agarose e colocação em tubos de eppendorf (A e B) para realização da purificação através do kit QIAquick® Gel Extraction (C).

Os produtos da PCR foram purificados empregando-se o kit de purificação “QIAquick® Gel Extraction” (QIAGEN) de acordo com as recomendações do fabricante (**Figura 3**).

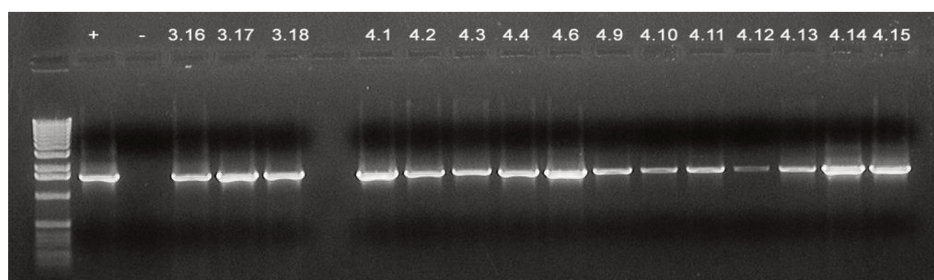


Figura 2– Eletroforese em gel de agarose demonstrando o produto da amplificação do DNA bacteriano de algumas amostras, com o controle positivo (+) e negativo (-).

Após a purificação, uma nova corrida em gel de agarose 2% foi realizada, empregando-se o marcador molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen®) para a quantificação aproximada de DNA amplificado e purificado (**Figura 4**). Para que o sequenciamento fosse realizado adequadamente, as amostras deveriam se apresentar com uma quantidade de DNA próxima a 40ng/μL. Para conseguir alcançar essa concentração de DNA ideal para o sequenciamento, foi necessário realizar a PCR em duplicata, e no momento da purificação os dois volumes de produto amplificado de cada amostra foram purificados juntos, ou seja, filtrado na mesma coluna do kit. As amostras que se apresentavam com maiores concentrações foram diluídas em água MilliQ estéril, e

as amostras com concentrações muito abaixo do ideal (por exemplo 4.12, na figura 4) foram descartadas e a PCR era repetida em triplicata para tentar aumentar a concentração de DNA.

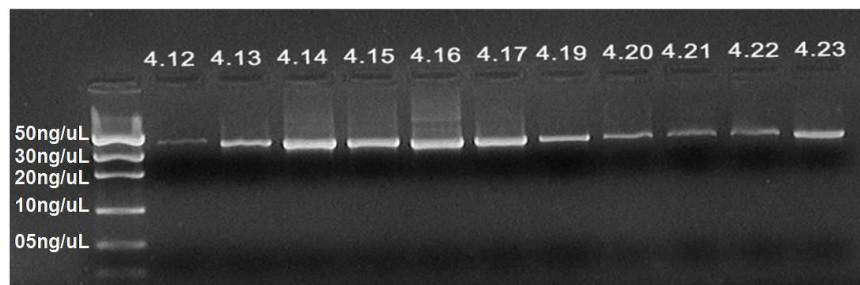


Figura 4 – Eletroforese em gel de agarose com o marcador molecular Low DNA Mass Ladder, demonstrando a concentração do produto da amplificação do DNA bacteriano após a sua purificação.

1.1.3 - Sequenciamento do gene 16S rRNA

Após quantificação as amostras foram armazenadas a -20°C , e no momento de enviá-las para realização da reação de sequenciamento, uma alíquota de 5 μL de cada amostra purificada na concentração aproximada de 40 $\text{ng}/\mu\text{L}$ foi misturada com 2,5 μL do primer específico diluído a 5 $\text{pmoles}/\mu\text{L}$ (Primer 533R - TKACCGCGGCTGCTG) (Ribeiro *et al.*, 2011). Os sequenciamentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa do Centro de Estudos do Genoma Humano (USP - São Paulo, SP, Brasil) e segundo informações fornecidas no site do laboratório (www.genoma.ib.usp.br), as reações de sequenciamento foram feitas utilizando o “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems, California, EUA). A análise do DNA foi feita utilizando o sistema “ABI 3730 DNA Analyser” (Applied Biosystems), alcançando em média sequências com 600 a 700 bases. As corridas foram feitas em capilares de 36 cm utilizando o polímero POP7, e as sequências foram analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1 utilizando o Base Caller KB.

Algumas amostras não obtiveram êxito no sequenciamento com o primer 533R, não sendo possível identificá-las genotipicamente. Para essas

amostras foi realizada a tentativa de sequenciamento com os primers universais utilizados na reação PCR para amplificar o gene 16S rRNA.

1.2 – CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

1.2.1 - Extração de DNA bacteriano das coletas clínicas

Dez coletas clínicas iniciais de canais radiculares de dentes com necrose pulpar, sintomatologia dolorosa e alteração periapical, realizadas previamente, foram utilizadas nesta etapa da pesquisa. Essas coletas foram feitas com cones de papel absorvente introduzidos nos canais radiculares e estavam armazenadas em tubos de eppendorf contendo 400 µL de meio de transporte VMGA III, mantidos a -80°C. Para a extração de DNA bacteriano também foi utilizado o kit “QIAamp DNA mini kit” (**Figura 1**) descrito anteriormente.

Os tubos com VMGA III e cones de papel absorvente foram deixados em temperatura ambiente e colocados no agitador de tubos (MA 162-MARCONI, São-Paulo, Brasil) por cerca de 2 minutos, para que as houvesse a homogeneização do VMGA e para que as bactérias impregnadas no cone de papel se desprendessem e misturassem no meio. Após agitação foram removidos 300 µL do VMGA III para a extração do DNA, que ao final do processo foi quantificado em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware, EUA) e armazenado a -20°C.

1.2.2 - Preparo de *Escherichia coli* DH5α – Células Eletrocompetentes

Um estoque de células DH5α deve ser mantido congelado em glicerina 40%, para que possam ser reativadas e transformadas em células eletrocompetentes no momento da realização da clonagem. Esse preparo (através de lavagens e centrifugações em baixas temperaturas) é necessário para remover o sal e reduzir a condutibilidade da solução celular, e sensibilizar as células para

incorporar o plasmídio durante a eletroporação. Alta condutibilidade pode resultar em problemas durante a eletroporação.

Após crescimento em meio de cultura Luria-Bertani Agar (LB Agar, Miller, Difco Laboratories Inc, Detroit, Michigan, EUA), uma Unidade Formadora de Colônia (UFC) foi utilizada para inocular 50 ml de LB caldo, em um frasco de 250 ml, que foi mantido sob agitação (120 rpm) a 37°C por 12-16 horas. Após esse período foi feito um teste de coloração de Gram para verificar a pureza da cultura e esses 50 mL foram transferidos para 1L de LB caldo, em frasco de 2L, mantido sob agitação (120 rpm) a 37°C até atingir a Densidade Óptica (OD 550) entre 0,5 e 0,6 (Jen Way – 6405 UV/Vis Spectrophotometer). O tempo para atingir essa densidade óptica é de aproximadamente 2-3 horas. Nesse momento foi feito outro teste de coloração de Gram para verificar a pureza da cultura (**Figura 5**).

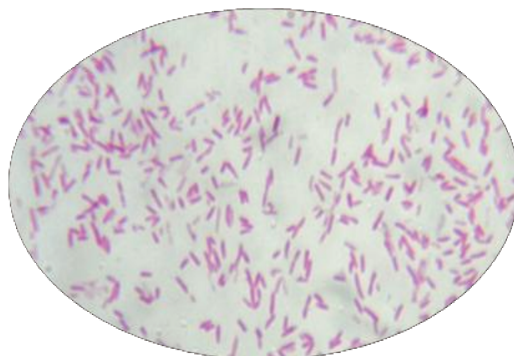


Figura 5 – Imagem microscópica da lâmina com coloração de Gram, comprovando a pureza da cultura de *E coli*.

Este 1 litro de cultura foi dividido em 4 tubos de 500 mL (aproximadamente 250 mL em cada tubo), deixados em gelo por 30 minutos e depois levados para centrifuga resfriada a 4°C. Após 15 minutos de centrifugação a 5000 rpm, o caldo sobrenadante foi descartado e o pelet de cada frasco ressuspenso em 200 mL de água MiliQ estéril e gelada até soltar todo pelet do fundo do frasco. O conteúdo foi transferido para apenas 2 frascos e outra vez foram centrifugados a 5000 rpm, a 4°C por 15 minutos. Após descartar novamente o sobrenadante, o pelet foi ressuspenso em 250 mL de água MiliQ estéril e gelada. Mais uma vez a centrifugação foi repetida, descartado o sobrenadante e o

pelet ressuspensionado em 20 mL de glicerol 10% estéril e gelado. Todas as pipetas e tubos utilizados deveriam estar também gelados. Depois o conteúdo foi transferido para 2 tubos de 50 mL e centrifugados a 6000 rpm, a 4°C por 15 minutos.

Nesse momento foi preparado um isopor com gelo seco e álcool contendo tubos eppendorf de 1,5 mL estéreis. O glicerol sobrenadante resultante da centrifugação foi mais uma vez descartado e o pelet ressuspensionado em 1 mL de glicerol 10% estéril e gelado, foi então distribuído nos eppendorfs que estavam no gelo seco e álcool (55 µL em cada), para promover o congelamento imediato das células. Após esses procedimentos as células foram armazenadas em freezer - 80°C até o momento de serem utilizadas.

1.2.3 - Clonagem do gene 16S rRNA extraído de amostras clínicas

Para realizar a clonagem foi necessária amplificação do gene 16S rRNA, da mesma maneira como descrito anteriormente para as bactérias isoladas. Os produtos da reação de amplificação do fragmento 16S rRNA de 10 amostras clínicas (coletas iniciais) foram purificados com o kit “QIAquick® Gel Extraction” (**Figura 3**). A reação de PCR foi realizada em triplicata para cada amostra, com objetivo de aumentar a concentração de DNA após o processo de purificação. A clonagem foi realizada utilizando-se o kit de clonagem chamado TOPO TA Cloning® (Invitrogen®) para obtenção de clones no vetor pCR®2.1-TOPO que foram incorporados por células de *Escherichia coli* DH5α eletrocompetentes com auxílio do Eletroporador (MicroPulser, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

1.2.3.1 – Reação de Ligação com Vetor e Eletroporação

Para fazer a reação de ligação com o vetor foi misturado 3 µL do produto de PCR purificado com 1 µL de água fornecida pelo kit, 1 µL da solução salina fornecida pelo kit (após diluição 1:4 com a água fornecida pelo kit) e 1 µL do

vetor pCR[®]2.1-TOPO. Essa mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos, segundo recomendações do fabricante.

Após período de incubação foi realizada a eletroporação, onde 2 µL da reação de ligação com vetor foi misturado lentamente com 55 µL de *E. coli* DH5α eletrocompetentes (preparadas previamente como descrito acima) e levadas ao Eletroporador MicroPulser para que as células incorporassem o vetor (plasmídeo), havendo assim a clonagem. Imediatamente após a eletroporação, 400 µL de meio de cultura SOC (Invitrogen[®]) foram adicionados e a solução incubada em frasco de vidro com tampa entre-aberta a 37°C sob agitação constante (cerca de 120 rpm) durante 1 hora. Este conteúdo foi posteriormente plaqueado em 4 placas de Petri contendo meio seletivo e incubadas a 37°C overnight (**Figura 6**).

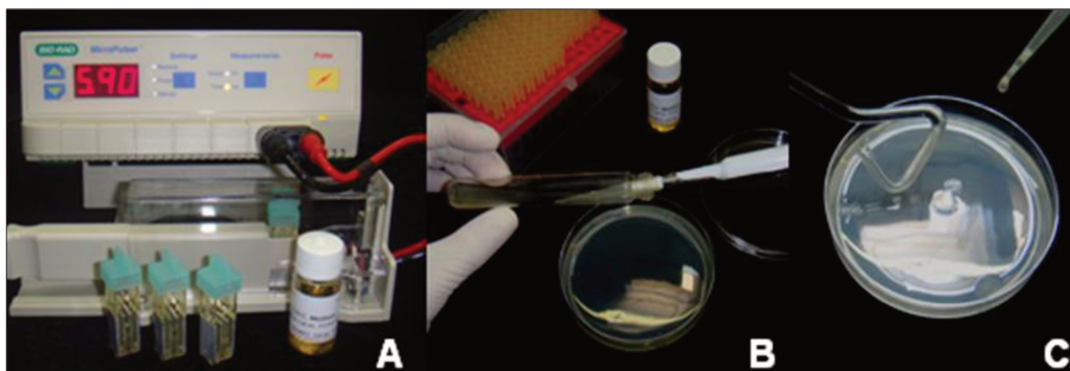


Figura 6 – **A:** Eletroporador, cuvetas e meio SOC; **B:** Plaqueamento após a clonagem com auxílio de alças drigalski.

1.2.3.2 – Preparo do Meio de Cultura Seletivo: Agar LB + Ampicilina + XGal

É necessário utilizar um meio de cultura seletivo específico, que permita o crescimento apenas de células de interesse, ou seja, *E. coli* que incorporaram o vetor com DNA, indicando sucesso da clonagem.

Após autoclavagem de 1L do meio de cultura LB Agar, quando este atingiu a temperatura de aproximadamente 50°C em banho maria, estando portanto ainda em estado líquido, foi acrescentado 500 µL de ampicilina (100mg/mL), resultando numa concentração de antibiótico de 50µg/mL. Após

verter o meio em placas de Petri e haver sua solidificação, 10 μ L de X-Gal (Promega, Itália) diluído na proporção de 4:1 foi espalhado na superfície do meio com auxílio de alças drigalski.

O vetor apresenta o gene de resistência à ampicilina, conferindo então essa resistência às *E coli* que o incorporaram pela eletroporação. Assim, não há crescimento das bactérias que não incorporaram o vetor.

Há também o gene lacZ no vetor, que determina a capacidade de degradação da galactose (X-Gal) pela β -galactosidase. Quando há degradação da galactose, percebe-se a formação de um composto azul, deixando então a colônia com cor azul. Quando há ligação do DNA extraídos das amostras com o vetor, a sequência desse gene é interrompida pela presença do inserto, e o gene passa a ser não-funcional (**Figura 7**). Não havendo a degradação da galactose a colônia permanece com a cor branca (**Figura 8**).

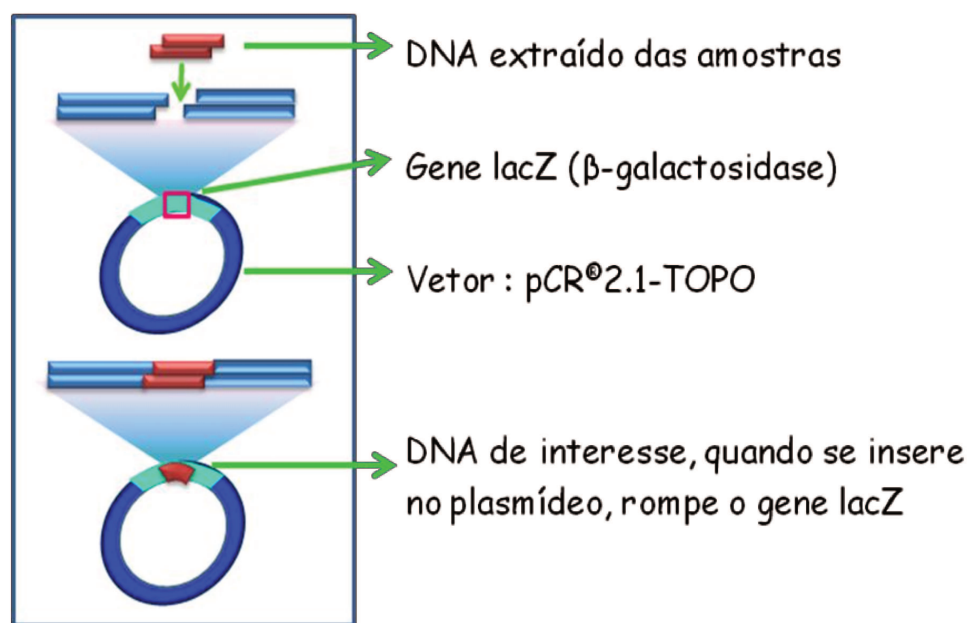


Figura 7 – Esquema representando a ligação do DNA de interesse no vetor.

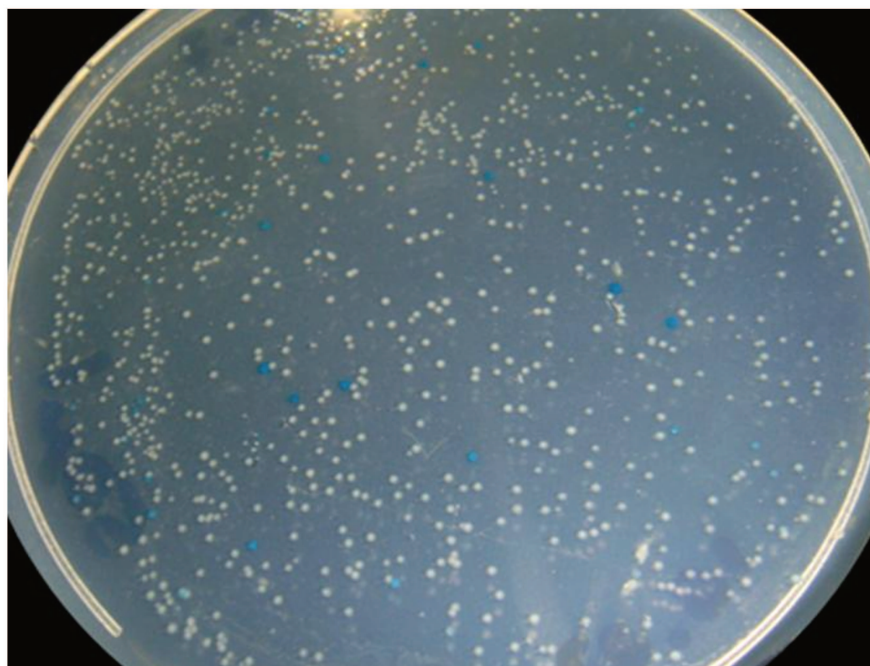


Figura 8 – Meio de cultura seletivo após incubação, mostrando colônias azuis (*E. coli* + vetor) e colônias brancas de interesse (*E. coli* + vetor + DNA extraído das amostras).

1.2.3.3 – Seleção das colônias de interesse e amplificação para sequenciamento

Após o período de incubação, 96 colônias brancas de cada amostra clonada foram selecionadas ao acaso e repicadas em outra placa com meio LB com ampicilina e após 24 hr foram ressuspensas individualmente em 40 µl de solução TE, e armazenadas em uma placa de 96 wells a -20°C (**Figura 9**).



Figura 9 – **A:** Seleção das colônias de interesse; **B:** Clones ressuspensos em TE.

Seis microlitros desta suspensão foram usados para uma PCR de 50 µl (6 µl da amostra + 34,3 µl de água miliQ estéril + 9,7 do mix de reagentes) com os primers fornecidos pelo kit de clonagem, o M13 F (GTAAAACGACGGCCAG) e M13 R (CAGGAAACAGCTATGAC), para determinar o tamanho correto de cada fragmento do 16S rRNA clonado e possibilitar sua amplificação.

O mix de reagentes era composto por 5 µl de Buffer 10X PCR; 2 µl de Cloreto de Magnésio; 0,5 de DNTP; 1 µl e cada primer; 0,2 µl de platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen®).

As condições do ciclo eram: desnaturação inicial a 94 °C por 10 min, 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 seg, anelamento a 60 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 1,5 min, seguido por uma extensão final a 72 °C por 10 min (Ribeiro *et al.*, 2011). Quatro microlitros do produto foram analisados através de eletroforese em gel de agarose 1 % para verificar posição e qualidade das bandas (banda única, com tamanho aproximado de 1650 pares de base). O restante do produto de PCR (46µl) foi purificado usando o kit de purificação “GFX PCR DNA Gel Band Purification” (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) para que posteriormente fosse feita a quantificação do DNA através de eletroforese em gel de agarose 2%, usando o marcador molecular “Low DNA Mass Ladder” (Invitrogen®).

Para prosseguir com o sequenciamento era necessária uma concentração de aproximadamente 40ng/µL. Algumas amostras apresentavam-se com uma concentração de DNA abaixo do recomendado (**Figura 10**), mesmo assim foram enviadas para realizar o sequenciamento.

As amostras foram então armazenadas a -20°C até o momento de enviá-las para sequenciamento, o qual foi realizado da mesma maneira já descrita para as bactérias isoladas.

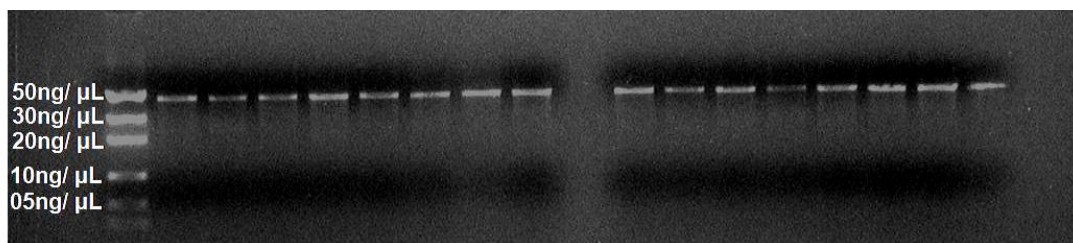


Figura 10 – Eletroforese em gel de agarose, com Low Mass DNA Ladder, demonstrando a baixa concentração de DNA do produto da reação M13 após a sua purificação, para algumas amostras testadas.

1.3 – ANÁLISE DOS RESULTADOS

As seqüências do 16S rRNA e respectivos eletroferogramas, tanto das amostras isoladas quanto dos clones, foram analisadas e editadas usando o software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) (**Figura 11**).

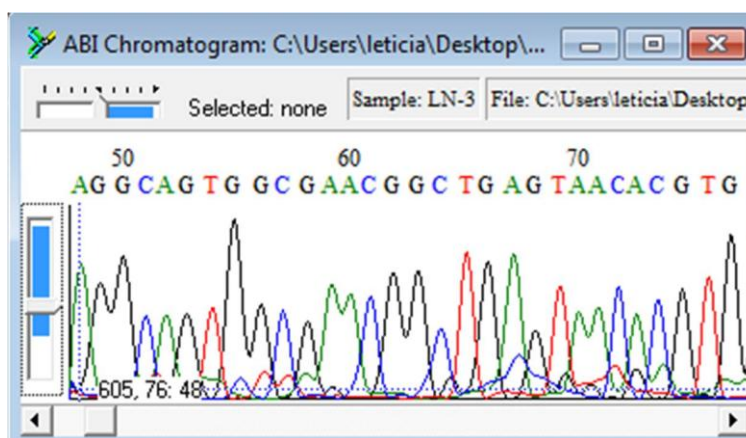


Figura 11 - Eletroferograma de uma amostra sendo analisado no software BioEdit.

Foram excluídas as seqüências que apresentaram mais de 4 bases ambíguas (sobreposição de picos no eletroferograma), enquanto que as seqüências com 4 ou menos bases ambíguas foram corrigidas a partir da interpretação do eletroferograma.

O BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) foi usado para comparar as seqüências de ácidos nucleícos obtidas (aproximadamente 600 pares de base) contra seqüências de nucleotídeos do banco de dados do *National Center for*

Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), a fim de determinar e identificar a posição filogenética da bactéria.

Apenas os resultados do BLAST com similaridades acima de 98% foram consideradas para a identificação das cepas.

Para determinar a similaridade e posição filogenética dos clones foi feito alinhamento múltiplo através do software Bionumerics (Applied Maths, Sint-martens-Latem, Bélgica), possibilitando a construção do dendograma.

1.3.1 – Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do software SPSS for Windows, considerando um nível de significância de 5%. O Teste Q-quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fischer foram utilizados para verificar associação entre espécies bacterianas e entre bactérias específicas e sinais e sintomas.

1.4 – CLONAGEM DE CEPAS ISOLADAS POR CULTURA E NÃO IDENTIFICADAS PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

Como explicado anteriormente, algumas amostras não obtiveram êxito no sequenciamento com o primer 533R, não sendo possível identificá-las genotipicamente. Para essas amostras foi realizada a tentativa de sequenciamento com os primers universais utilizados na reação PCR para amplificar o gene 16S rRNA. Entretanto, mesmo após esta segunda tentativa, algumas cepas permaneceram sem identificação genotípica, pois a sequência obtida foi inadequada para análise. Apresentavam muitas bases ambíguas ou a sequência estava muito curta (menos de 400 pares de base) para comparação com o banco de dados (GenBank – NCBI).

Considerando a possibilidade do erro no sequenciamento ser devido a ausência de uma cultura pura, foi realizado a clonagem na tentativa de promover uma separação desse DNA, em 4 cepas isoladas dos casos 1, 2, 5 e 6. Todas as etapas realizadas já foram descritas acima, nas sessões **1.2** e **1.3**.

APÊNDICE

2 - DETALHAMENTO DOS RESULTADOS

Todos os pacientes apresentavam quadro clínico compatível com abscesso periapical agudo, caracterizado por necrose pulpar, edema, dor espontânea, alteração periapical visível radiograficamente e dor a percussão. As características clínicas de cada caso encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1 – Aspectos clínicos e radiográficos dos 20 casos estudados

CASO	DENTE	LESAO	ESAP	CONDIÇÃO	DPE	DPA	EXUD	ODOR	MOB
1	11	N	S	Car	S	S	N	S	S
2	23	N	S	Car	S	S	Pur	N	N
3	42	S	N	Híg	S	N	Pur	S	S
4	26	S	N	Rest	S	N	Pur	S	N
5	22	S	N	Rest	S	S	Pur	S	S
6	46	S	N	Car	S	N	Pur	S	N
7	11	S	N	Rest	S	S	Pur	S	S
8	11	S	N	Híg	S	S	N	N	S
9	12	N	S	Rest	S	S	Pur	S	N
10	41	S	N	Híg	S	S	Hem	N	N
11	25	S	N	Car	S	S	N	N	N
12	37	S	N	Car	S	S	N	N	N
13	13	S	N	Car	S	N	H-P	N	N
14	16	S	N	Car	S	S	Pur	N	S
15	16	S	N	Rest	S	S	N	S	N
16	46	S	N	Car	S	N	Pur	S	N
17	12	S	N	Rest	S	S	Pur	S	S
18	33	S	N	Rest	S	N	H-P	S	N
19	36	N	S	Rest	S	S	Hem	S	S
20	22	S	N	Híg	S	N	Hem	N	N

S: sim; **N:** não; **ESAP:** espessamento apical; **Car:** cariado; **Híg:** hígido; **Rest:** restaurado; **DPE:** dor à percussão; **DPA:** dor à palpação; **EXUD:** exudato; **Pur:** purulento; **Hem:** hemorrágico; **H-P:** hemorrágico e purulento; **MOB:** mobilidade.

2.1 – IDENTIFICAÇÕES GENOTÍPICA DE BACTERIAS ISOLADAS POR CULTURA MICROBIOLÓGICA

Duzentos e vinte cepas foram isoladas por cultura, previamente identificadas bioquimicamente (Montagner, 2009) e mantidas em freezer -80°C até o momento de serem processadas para identificação genotípica.

Pelos testes bioquímicos foi possível identificar 155 cepas (70,5%), num total de 34 espécies diferentes, e pelo sequenciamento do gene 16S rRNA foram identificadas 215 cepas, sendo 57 espécies diferentes (97%). A média do número de espécies por canal foi de 5 pelos testes bioquímicos e 6 pelo sequenciamento

Houve uma concordância de 49% entre os métodos de identificação bioquímica e molecular, sendo 27,7% em nível de gênero e 21,3% em nível de espécie (**Gráfico1**). Foi observada concordância estatisticamente significativa entre os 2 métodos na identificação de *Prevotella buccae*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* and *Propionibacterium acnes* ($p<0.05$; OR=2.500; IC=1.170-5.341).

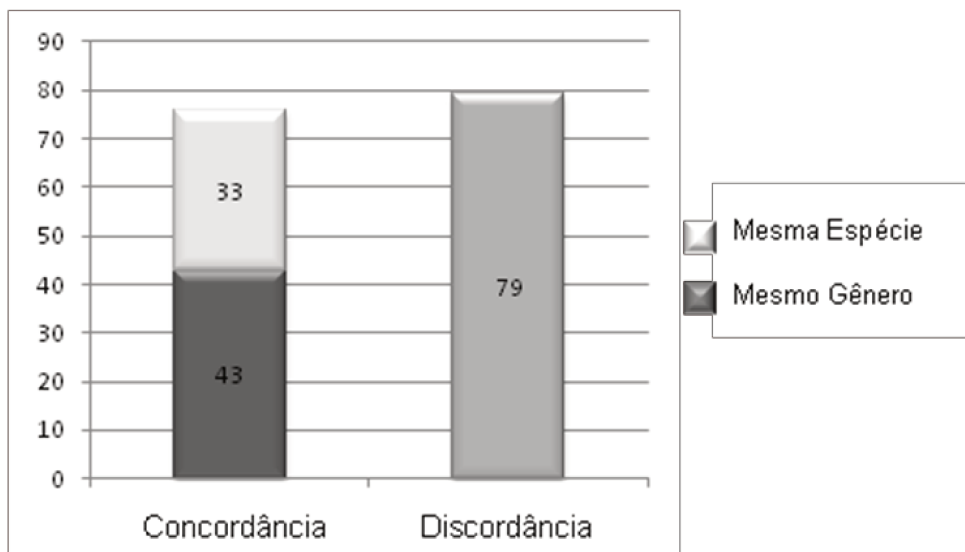


Gráfico 1 – Numero de amostras onde houve concordância ou discordância entre os métodos de identificação bioquímico e molecular

As bactérias mais frequentemente identificadas bioquimicamente foram: *Prevotella* spp. (16/20), *Parvimonas micra* (10/20), *Gemella morbilorum* (7/20), *Bacteroides ureolyticus* (4/20), *Finegoldia magna* (4/20) e *Fusobacterium* spp. (4/20). Pelo sequenciamento as mais frequentes foram: *Prevotella* spp. (16/10), *Pseudoramibacter alactolyticus* (9/20), *Parvimonas micra* (6/20), *Dialister invisus* (6/20), *Filifactor alocis* (4/20), *Peptostreptococcus stomatis* (4/20) (**Gráfico 2**).

Alguns patógenos endodônticos, importantes nas infecções endodônticas primárias como *Dialister invisus*, *Dialister pneumosintes*, *Filifactor alocis*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Slackia exigua*, *Atopobium rimae* e *Olsenella uli* foram identificados somente genotipicamente.

O **Quadro 1** mostra a identificação bioquímica e por sequenciamento de cada cepa isolada. Características da parede celular e requerimento gasoso das cepas isoladas também estão no **Quadro 1**. A maioria das bactérias identificadas, por ambos os métodos, eram anaeróbias estritas, e foi observado equilíbrio entre o número de gram-negativas e gram-positivas. A identificação bioquímica revelou 12 espécies anaeróbias gram-negativas, 14 anaeróbias gram-positivas, 12 facultativas gram-negativas e 6 facultativas gram-positivas. Já o sequenciamento mostrou 25 anaeróbias gram-negativas, 18 anaeróbias gram-positivas, 3 facultativas gram-negativas e 11 facultativas gram-positivas.

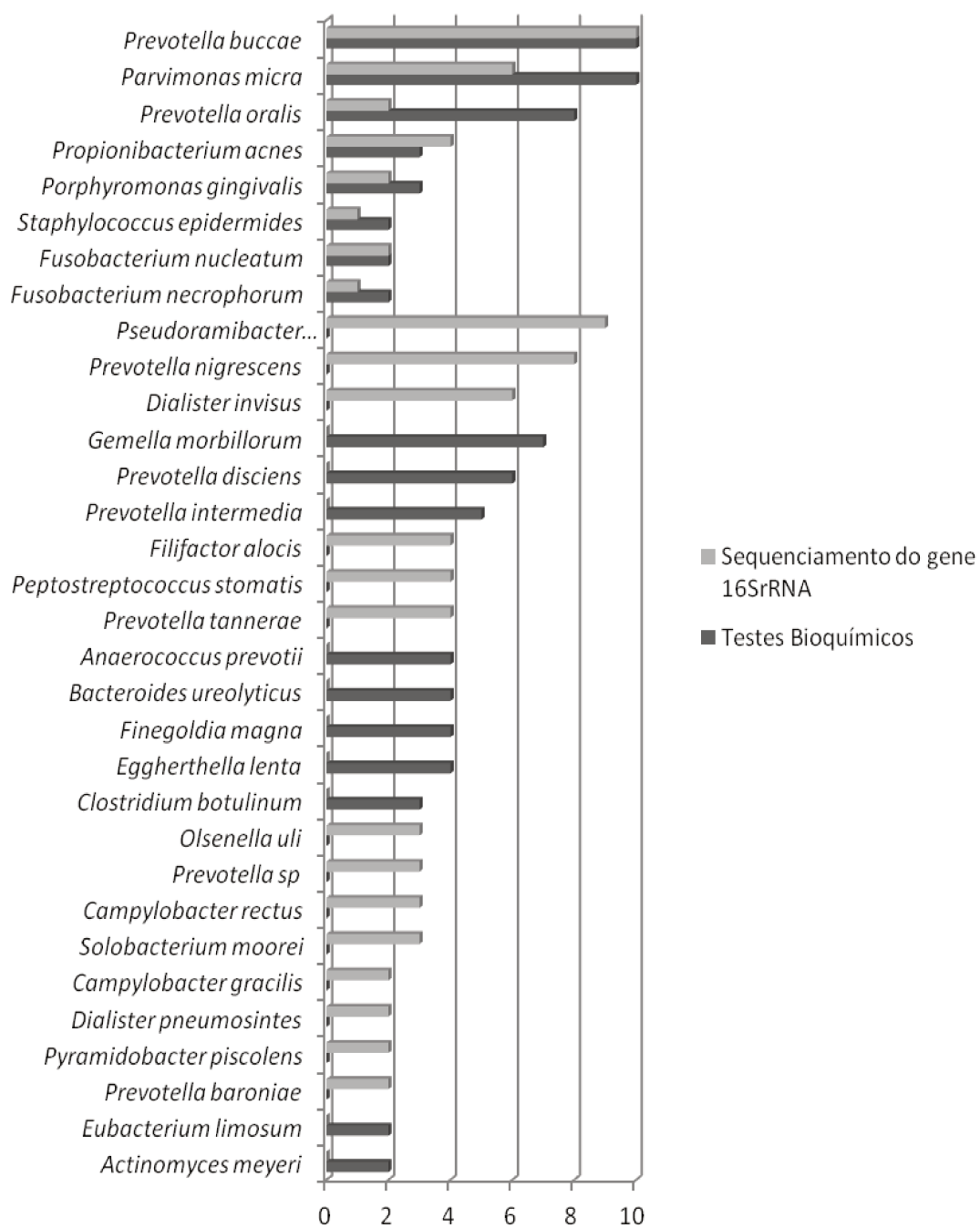


Gráfico 2 – Bactérias mais frequentemente identificadas pelo Sequenciamento do gene 16S rRNA e pelos testes bioquímicos.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, características morfológicas, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura. (continua)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
1	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Finegoldia magna</i>	Coco A+	<i>Atopobium rimae</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella denticola</i>	Bacilo A-
	<i>Finegoldia magna</i>	Coco A+	<i>Atopobium rimae</i>	Bacilo A+
	<i>Actinomyces naeslundii</i>	Bacilo F+	<i>Lactobacillus fermentum</i>	Bacilos F+
	<i>Finegoldia magna</i>	Coco A+	<i>Atopobium rimae</i>	Bacilo A+
	<i>Finegoldia magna</i>	Coco A+	<i>Parascardovia denticolens</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	ERRO	-
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bacilo A+	<i>Bifidobacterium dentium</i>	Bacilo A+
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	Bacilo A+	<i>Bifidobacterium dentium</i>	Bacilo A+
	<i>Capnocytophaga</i> sp	Bacilo F-	<i>Prevotella denticola</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Dialister invisus</i>	Coco A-
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bacilo A+	<i>Parascardovia denticolens</i>	Bacilo A+
	<i>Prevotella disiens</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella intermedia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella multisacharivorax</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	<i>Gemella morbillorum</i>	Coco F+	<i>Lactobacillus casei</i>	Bacilo F+

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, característica morfológica, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura. (Continuação)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
2	<i>Propionibacterium propionicus</i>	Bacilo A+	<i>Propionibacterium acidifaciens</i>	Bacilo A+
	<i>Gemella morbillorum</i>	Coco F+	<i>Olsenella</i> sp.	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Olsenella</i> sp.	Bacilo A+
	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	Bacilo A-	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Gemella morbillorum</i>	Coco F+	<i>Olsenella profusa</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Scardovia inopinata</i>	Coco A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	ERRO	-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Olsenella</i> sp.	Bacilo A+
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella tanneriae</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	Bacilo A-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	Bacilo A-	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella disiens</i>	Bacilo A-	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	Bacilo A-	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	Bacilo A-	<i>Olsenella profusa</i>	Bacilo A+
	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	Bacilo A-	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	Bacilo A-	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Porphyromonas uenonis</i>	Bacilo A-

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, característica morfológica, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura. (Continuação)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bacilo A-	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Slackia exigua</i>	Bacilo A+
	<i>Streptococcus constelatus</i>	Coco F+	<i>Streptococcus gordonii</i>	Coco F+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Slackia exigua</i>	Bacilo A+
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bacilo A-	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Bifidobacterium</i> sp.	Bacilo A+	<i>Prevotella oris</i>	Bacilo A-
	<i>Veillonella</i> sp.	Coco A-	<i>Veillonella parvula</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Aggregatibacter aphrophilus</i>	Bacilo F-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	<i>Clostridium botulinum</i>	Bacilo A+	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	Coco F+
	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
4	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	<i>Anaerococcus prevotii</i>	Coco A+	<i>Solobacterium moorei</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Anaerococcus prevotii</i>	Coco A+	<i>Solobacterium moorei</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Dialister invisus</i>	Coco A-
	<i>Actinomyces meyeri</i>	Bacilo F+	<i>Actinomyces georgiae</i>	Bacilo F+
	<i>Prevotella intermedia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella tanneriae</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Actinomyces georgiae</i>	Bacilo A+
	<i>Actinomyces meyeri</i>	Bacilo F+	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella disiens</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, característica morfológica, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura. (Continuação)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
5	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Dialister invisus</i>	Coco A-
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Phocaeicola abscessus</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	ERRO	-
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Slackia exígua</i>	Bacilo A+
	<i>Clostridium bifermentans</i>	Bacilo A+	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Slackia exigua</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Campylobacter rectus</i>	Bacilo F-
6	NÃO IDENTIFICADO	-	<i>Streptococcus mutans</i>	Coco F+
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Bacilo A-	<i>Veillonella díspar</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADO	-	<i>Veillonella díspar</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADO	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	NÃO IDENTIFICADO	-	<i>Atopobium parvulum</i>	Bacilo A+
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Veillonella díspar</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADO	-	<i>Streptococcus mutans</i>	Coco F+
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Atopobium parvulum</i>	Bacilo A+
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Atopobium parvulum</i>	Bacilo A+
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADO	-	<i>Streptococcus mutans</i>	Coco F+
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Coco F+	ERRO	-
	NÃO IDENTIFICADO	-	<i>Prevotella oulorum</i>	Bacilo A-

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, característica morfológica, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura. (Continuação)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
7	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Campylobacter rectus</i>	Bacilo F-
	<i>Eggerthella lenta</i>	Bacilo A+	<i>Campylobacter rectus</i>	Bacilo F-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella</i> sp.	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella</i> sp.	Bacilo A-
	<i>Anaerococcus prevotii</i>	Coco A+	<i>Dialister pneumosintes</i>	Coco A-
8	<i>Clostridium difficile</i>	Bacilo A+	<i>Filifactor alocis</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Dialister pneumosintes</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Dialister pneumosintes</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Solobacterium moorei</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Dialister pneumosintes</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	Coco F+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Campylobacter rectus</i>	Bacilo F-
9	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Bacilo A-	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella disciens</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas</i> sp.	Bacilo A-
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Solobacterium moorei</i>	Bacilo A+
	<i>Eggerthella lenta</i>	Bacilo A+	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	Coco F+
	<i>Prevotella intermedia</i>	Bacilo A-	<i>Eubacterium</i> sp.	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella disciens</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Finegoldia magna</i>	Coco A+	<i>Lactobacillus catenaformis</i>	Bacilo A+
	<i>Prevotella disciens</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella tannerae</i>	Bacilo A-

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, característica morfológica, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura. (Continuação)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
10	<i>Prevotella disciens</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella tannerae</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella marshii</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella baroniae</i>	Bacilo A-
	<i>Clostridium</i> sp.	Bacilo A+	<i>Filifactor alocis</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella tannerae</i>	Bacilo A-
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Slackia exígua</i>	Bacilo A+
	<i>Anaerococcus prevotii</i>	Coco A+	<i>Eubacterium</i> sp.	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella tannerae</i>	Bacilo A-
	<i>Anaerococcus prevotii</i>	Coco A+	<i>Filifactor alocis</i>	Bacilo A+
11	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Slackia exígua</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Dialister invisus</i>	Coco A-
	<i>Eggherthella lenta</i>	Bacilo A+	<i>Pyramidobacter pisolens</i>	Bacilo A-
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Dialister invisus</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, característica morfológica, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura.
(Continuação)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
12	<i>Staphylococcus epidermides</i>	Coco F+	<i>Staphylococcus epidermides</i>	Coco F+
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella melaninogenica</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella oris</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella sp.</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Dialister invisus</i>	Coco A-
	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-	<i>Dialister invisus</i>	Coco A-
	<i>Prevotella intermédia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella intermédia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella disciens</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella disciens</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
13	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Lactobacillus casei</i>	Bacilo F+
	<i>Aerococcus viridans</i>	Coco F+	<i>Enterococcus faecalis</i>	Coco F+
	<i>Gemella morbilorum</i>	Coco F+	<i>Streptococcus mutans</i>	Coco F+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Streptococcus anginosus</i>	Coco F+
	<i>Aerococcus viridans</i>	Coco F+	<i>Enterococcus faecalis</i>	Coco F+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Streptococcus anginosus</i>	Coco F+
14	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo A+	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo A+
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Neisseria sp.</i>	Coco F-	ERRO	-

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, característica morfológica, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura. (Continuação)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
15	<i>Prevotella intermédia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Clostridium tetani</i>	Bacilo A+	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Eubacterium limosum</i>	Bacilo A+	<i>Eubacterium infirmum</i>	Bacilo A+
	<i>Bacteroides capillosus</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella oralis</i>	Bacilo A-
	<i>Finegoldia magna</i>	Coco A+	<i>Lactobacillus catenaformis</i>	Bacilo F+
	<i>Anaerococcus prevotii</i>	Coco A+	<i>Olsenella uli</i>	Bacilo A+
	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella buccae</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella intermédia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella intermédia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella intermédia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	<i>Prevotella intermédia</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
16	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Bacillus drentensis</i>	Bacilo F+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Dialister pneumosites</i>	Coco A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Olsenella sp.</i>	Bacilo A+
	<i>Prevotella loischeu</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella sp.</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella nigrescens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacilo A-
	<i>Clostridium botulinum</i>	Bacilo A+	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	<i>Actinomyces meyeri</i>	Bacilo F+	<i>Olsenella sp.</i>	Bacilo A+
	<i>Bacterioides ureolyticus</i>	Bacilo A-	<i>Bilophila wadsworthia</i>	Bacilo A-

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

Quadro 1 – Identificação bioquímica e pelo sequenciamento, característica morfológica, requerimento gasoso e coloração de Gram de cada cepa isolada por cultura. (Conclusão)

Caso	Identificação Bioquímica	M/RC/G	Sequenciamento	M/RC/G
17	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Dialister invisus</i>	Coco A-
	<i>Clostridium botulinum</i>	Bacilo A+	<i>Campylobacter gracilis</i>	Bacilo F-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacilo A-
	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	Bacilo A-	<i>Filifactor alocis</i>	Bacilo A+
	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo A+	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacilo A-
	<i>Clostridium bifermentans</i>	Bacilo A+	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Bacilo A-
18	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Peptococcus Níger</i>	Coco A+
	<i>Finegoldia magna</i>	Coco A+	<i>Atopobium rimae</i>	Bacilo A+
	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo A+	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo A+
	<i>Clostridium</i> sp.	Bacilo A+	<i>Peptococcus Níger</i>	Coco A+
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bacilo A-	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Bacilo A-
	<i>Eggherthella lenta</i>	Bacilo A+	<i>Filifactor alocis</i>	Bacilo A+
	<i>Finegoldia magna</i>	Coco A+	<i>Atopobium rimae</i>	Bacilo A+
C19	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	Coco F+
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Selemonas</i> sp.	Bacilo A-
	<i>Peptostreptococcus micros</i>	Coco A+	<i>Parvimonas micra</i>	Coco A+
	<i>Clostridium botulinum</i>	Bacilo A+	<i>Campylobacter gracilis</i>	Bacilo F-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Prevotella baroniae</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Olsenella uli</i>	Bacilo A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Campylobacter gracilis</i>	Bacilo F-
C20	<i>Prevotella bucae</i>	Bacilo A-	<i>Prevotella bucae</i>	Bacilo A-
	<i>Eubacterium limosum</i>	Bacilo A+	<i>Pyramidobacter pisciolens</i>	Bacilo A-
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Olsenella uli</i>	Bacilo A+
	<i>Bacteroides ureolyticus</i>	Bacilo A-	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	Coco A+
	NÃO IDENTIFICADA	-	<i>Propionibacterium acnes</i>	Bacilo A+

M: morfologia; **RC:** requerimento gasoso; **G:** gram; **A-:** anaeróbio gram-negativo; **A+:** anaeróbio gram-positivo; **F-:** facultativo gram-negativo; **F+:** facultativo gram-positivo.

As amostras não identificadas bioquimicamente (65/220), que estiveram presentes em 17 casos, foram caracterizadas em 97% (63/65) pelo sequenciamento, e incluíram *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Prevotella* spp, *Dialister* spp, *Campylobacter* spp, *Olsenella* spp. entre outros.

Cinco cepas permaneceram sem identificação após o sequenciamento, pois a sequência obtida foi inadequada para análise. Apresentavam muitas bases ambíguas ou a sequência estava muito curta (menos de 400 pares de base) para comparação com o banco de dados (GenBank – NCBI). Duas dessas já não haviam sido identificadas bioquimicamente, e as outras 2 foram identificadas como *Parvimonas micra* e *Neisseria* sp. , porém não foi possível a identificação genotípica.

Houve uma concordância significativa entre os 2 métodos na identificação de *Prevotella buccae*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum* e *Propionibacterium acnes* ($p < 0.05$; OR=2.500; IC=1.170-5.341). Considerando a identificação genotípica, foi observado uma associação entre *Prevotella buccae* e *Pseudoramibacter alactolyticus* ($p < 0.05$; OR=9.333; IC=1.193-72.999), e entre *Parvimonas micra* e *Prevotella nigrescens* ($p < 0.05$; OR= 18.333; IC= 1.508-222.875). Não foi encontrada associação entre bactérias e sinais e sintomas.

2.2 – CLONAGEM DO GENE 16S rRNA

De cada caso submetido à clonagem, 96 colônias foram selecionadas para análise por sequenciamento, resultando em 960 clones a serem processados. Após a reação de PCR com primer M-13, 799 clones foram sequenciados.

Sequências com mais de 4 bases ambíguas ou extensão reduzida (<400 pares de base) foram descartadas, resultando em 689 sequências apropriadas para análise filogenética.

Firmicutes foi o filo com maior representatividade, detectado nos 10 casos estudados, correspondendo a 43,5% dos clones analisados (**Gráfico 3**). O filo *Bacteroidetes* (22,5%), presente em 9 casos, foi o segundo mais prevalente. *Fusobacteria* representou somente 3,9% dos clones analisados, entretanto esteve presente em 7 casos. *Proteobacteria* (13,2%) foi detectado em 5 casos, *Actinobacteria* (6,5%) em 4 casos, *Synergistetes* (5,2%) e *Spirochaetes* (3,9%) em 2 casos e *Deinococcus-Thermus* (1,3%) em 1 caso.

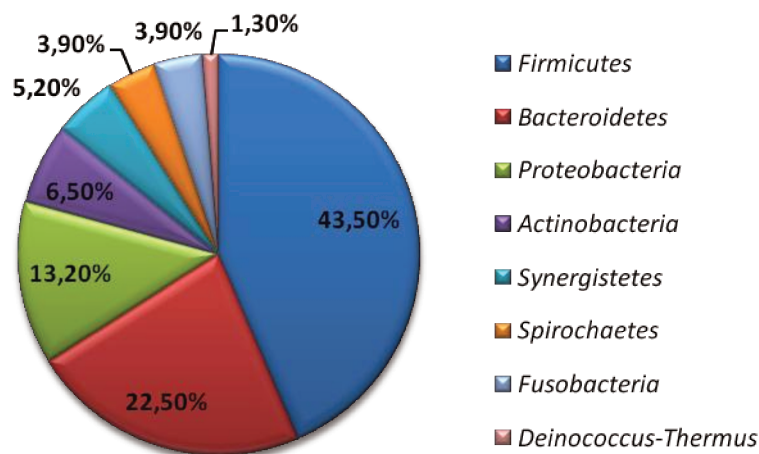


Gráfico 3 – Prevalência de cada filotectado pela clonagem bacteriana

Foi observada uma grande heterogeneidade entre os pacientes estudados e nenhum caso abrigou os 8 filos detectados. O caso 6 apresentou 11 filotipos diferentes, pertencentes apenas aos filos *Firmicutes* e *Bacteroidetes*, enquanto que o caso 8 apresentou *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*,

Fusobacteria, *Spirochaetes* e *Synergistetes*, num total de 21 filotipos diferentes, sendo o caso que apresentou maior diversidade.

Setenta e seis filotipos diferentes foram identificados com homologia maior que 98% com sequências depositadas no GenBank do NCBI, dos quais 48 (63,15%) foram espécies diferentes e 28 (36,84%) correspondiam a espécies ainda não cultiváveis ou não caracterizadas. Quarenta e três filotipos estavam presentes em apenas 1 caso.

Espécies do gênero *Prevotella*, incluindo *P. baroniae*, *P. buccae*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. maculosa*, *P. marshii*, *P. oris* e *P. oulorum* foram detectadas em 9 das 10 amostras estudadas. *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis* e *Peptostreptococcus stomatis* foram as bactérias mais frequentemente identificadas (6 das 10 amostras), seguidos por *Dialister invisus*, *Phocaeicola abscessus*, *Lachnospiraceae oral clone* (5/10 casos), *Porphyromonas* spp. e *Parvimonas micra* (4/10 casos).

O **Gráfico 4** mostra o número de casos onde as bactérias mais frequentes foram detectadas.

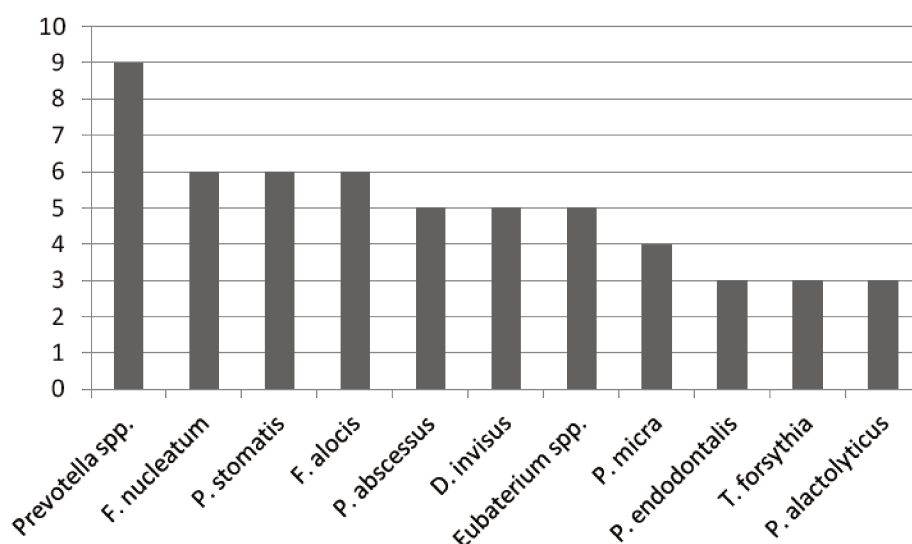


Gráfico 4 – Número de casos que apresentaram as bactérias mais frequentemente identificadas

A média de filotipos diferentes em cada caso foi de 15, variando de 11 à 21, e a maioria eram anaeróbios gram-negativos. A **Tabela 2** mostra todos os filotipos identificados, o respectivos números de acesso no GenBank do NCBI, e os casos que abrigaram cada filotipo.

Tabela 2 – Filotipos identificados, número de acesso e casos onde foram detectados (continua)

Provável gênero e espécie	Nº acesso	Caso
<i>Acinetobacter lwofii</i>	FN393790	3
<i>Actinomycetales bacterium</i>	EU598252	3
<i>Atopobium rimae</i>	AF292371	2/5
<i>Bacteroidales oral clone</i>	AF481206	9
<i>Bacteroidetes bacterium</i>	FJ577256	3/8
<i>Campylobacter gracilis</i>	AB663242	1
<i>Campylobacter rectus</i>	DQ174169	7/8
<i>Campylobacter</i> sp	DQ087191	7
<i>Catonella morbi</i>	NR_026248	7
<i>Clostridiales bacterium</i>	AF481208	9
<i>Deferribacteres</i> sp	AY349371	8
<i>Deinococcus</i> sp	AF385541	3
<i>Dialister invisus</i>	AB626632	2/4/5/7/8
<i>Dialister pneumosintes</i>	NR_026229	5/7/8
<i>Enterobacter</i> sp	HM625774	8
<i>Enterococcus faecalis</i>	AB362602	6
<i>Escherichia coli</i>	AB480776	3/4/7
<i>Eubacteriaceae oral clone</i>	AF538856	2/5/7
<i>Eubacterium infirmum</i>	HM596276	4/5/10
<i>Eubacterium minutum</i>	AB020885	4/5
<i>Eubacterium</i> sp	AF287762	2/4/7/8
<i>Eubacterium yurii</i> ssp <i>yurii</i>	L34629	8
<i>Exiguobacterium mexicanum</i>	JF505980	3
<i>Filifactor alocis</i>	AJ006962	2/4/5/7/8/10
<i>Firmicutes oral clone</i>	AF287771	2/8/9
<i>Flexistipes-like</i> sp oral clone	AY005444	10
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	EF153310	9
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	FJ471660	2/4/5/7/8/10
<i>Fusobacterium</i> sp	AF287805	7
<i>Lachnospiraceae oral clone</i>	AF481218	2/4/5/6/8
<i>Micrococcus flavus</i>	HM196864	3
<i>Olsenella profusa</i>	AF292374	1
<i>Olsenella profusa</i>	AF292374	1
<i>Olsenella uli</i>	FN178464	2
<i>Paracoccus</i> sp	AB362825	3

Tabela 2 – Filotipos identificados, número de acesso e casos onde foram detectados (continuação)

Provável gênero e espécie	Nº acesso	Caso
<i>Parvimonas micra</i>	AY323523	2/4/5/9
<i>Peptostreptococcus stomatis</i>	DQ160208	2/4/6/7/8/9
<i>Phocaeicola abscessus</i>	NR_044556	2/5/8/9/10
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	AB547659	4/7/9
<i>Porphyromonas uenonis</i>	GQ422746	1
<i>Prevotella baroniae</i>	FJ940880	4/8/10
<i>Prevotella buccae</i>	AB547675	2/7
<i>Prevotella denticola</i>	AB547680	2/5
<i>Prevotella intermédia</i>	AF414829	5
<i>Prevotella loescheii</i>	AY836508	1
<i>Prevotella maculosa</i>	EF534314	8
<i>Prevotella marshii</i>	NR_041907	10
<i>Prevotella oris</i>	GQ131410	4/5/9
<i>Prevotella oulorum</i>	NR_029147	6
<i>Prevotella</i> sp	AY005056	1/2/7/8/10
<i>Prevotella tanneriae</i>	AF183406	1/10
<i>Pseudomonas</i> sp	AJ007004	3
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	AB036761	1/4/5
<i>Shuttleworthia satellites</i>	NR_028827	4/5
<i>Solobacterium moorei</i>	GQ182982	4/5
<i>Solobacterium</i> sp	AB256031	2/9
<i>Streptococcus constelatus</i>	AF104676	1
<i>Streptococcus intermedius</i>	NR_028736	1
<i>Streptococcus mitis</i>	AY518677	6
<i>Streptococcus mutans</i>	AY188348	6
<i>Streptococcus salivaris</i>	AY188352	6
<i>Streptococcus</i> sp	AY953255	6
<i>Synergistetes bacterium</i>	GQ149247	10
<i>Tannerella forsythia</i>	DQ344918	7/8/10
<i>Treponema denticola</i>	AF139203	8
<i>Treponema socranskii</i> ssp	AB015890	8/10
<i>Treponema</i> sp	AY349418	10
Uncultured <i>bacterium</i>	EF510405	1
Uncultured <i>bacterium</i>	GQ157701	3
Uncultured <i>bacterium</i>	FJ558096	6
Uncultured <i>bacterium</i>	DQ799777	9
Uncultured <i>Lachnospiraceae</i>	AM420101	4/5
Uncultured <i>Sphingomonas</i> sp	FJ191542	3
Uncultured <i>Synergistes</i> sp	FJ976390	8/10
<i>Veillonellaceae bacterium</i>	GQ422718	5/6
<i>Veillonella parvula</i>	AB538437	1
<i>Vellonella dispar</i>	GQ422726	6

O dendrograma contruído para analisar a relação filogenética entre os filotipos encontra-se na **Figura 1**, e foi construído baseado no alinhamento dos 1500 pares de base.

O número de clones analisados em cada caso variou de 55 à 86, dependendo da qualidade dos fragmentos sequenciados. Considerando a microbiota detectada em cada caso, foi estimado a proporção de detecção de cada filotipo.

A maioria dos filotipos identificados neste estudo representava menos de 10% da microbiota total identificada em cada amostra. Já algumas espécies correspondia a mais de 30% da microbiota da amostra.

Prevotella oris correspondeu a mais de 10% da microbiota total detectada nos casos 4 e 5. Outras espécies do gênero *Prevotella* corresponderam a menos de 10%. Em alguns casos, as espécies mais frequentemente identificadas representaram mais de 10% da microbiota. *Phocaeicola abscessus* representou mais de 30% da microbiota no caso 10.

Espécies encontradas em apenas 1 caso, como *Exiguobacterium mexicanum*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus intermedius*, foram encontradas numa alta proporção (mais de 30%). *Veillonella parvula*, *Micococcus flavus*, *Acinetobacter lwoffii* e *Paracoccus sp.* representou mais de 10% da microbiota dos casos onde foram detedtdadas (**Figura 1**).

Associação positiva foi observada entre a bactéria Gram-positiva *P. micra* e a Gram-negativa *P. oris* ($p<0.05$; OR=4.000; IC=0.733-21.888).

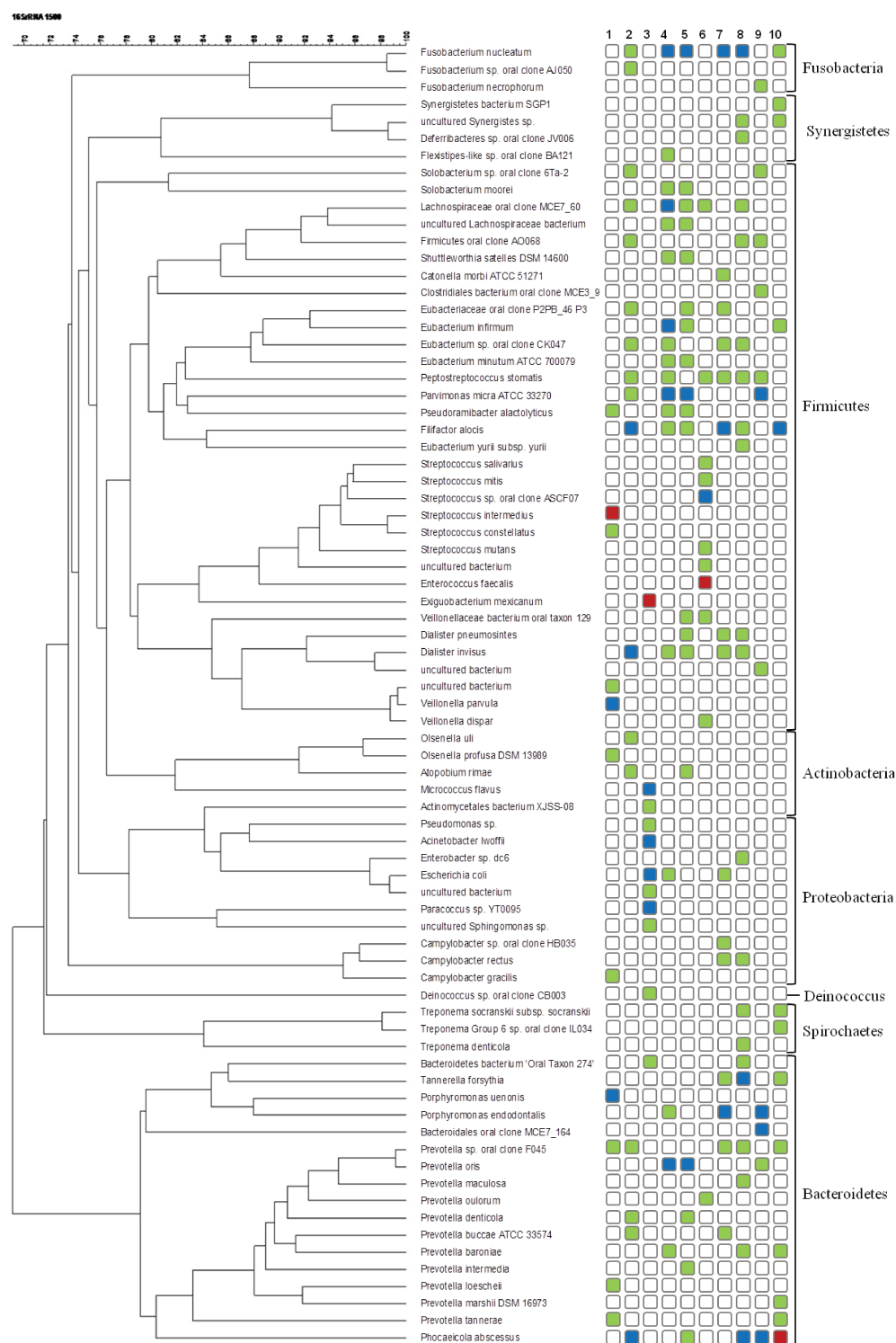


Figure 1 – Árvore filogenética baseada no gene 16S rRNA (1500bp). As barras representam a porcentagem de similaridade das sequências. A coluna de quadrados representa o perfil bacteriano de cada amostra, e a proporção é indicada pelas cores: branco (ausente), verde (<10%), azul (10%-30%), vermelho (>30%).

1.3 – CLONAGENS DE CEPAS ISOLADAS POR CULTURA E NÃO IDENTIFICADAS PELO SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA

A clonagem das cepas não identificadas pelo sequenciamento realmente mostrou que não se tratava de uma cultura pura, justificando a impossibilidade de identificação através da metodologia de sequenciamento empregada neste estudo, exceto na cepa isolada do caso 6. As identificações dessas cepas encontram-se na **Tabela 3** abaixo.

Não foi possível realizar clonagem da cepa isolada do caso 2, provavelmente devido degradação do DNA extraído.

Tabela 3 – Identificação das 4 cepas não identificadas pelo Sequenciamento do gene 16S rRNA .

Amostra	Ident. Bioquímica	Seq. 16S rRNA	Clonagem
C1	NÃO IDENTIFICADA	ERRO	<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Bacillis licheniformis</i>
C2	NÃO IDENTIFICADA	ERRO	ERRO
C5	<i>Parvimonas micra</i>	ERRO	<i>Pyramidobacter pisciolens</i> <i>Phocaeicola abscessus</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Parvimonas micra</i>
C6	<i>Staphilococcus epidermides</i>	ERRO	<i>Veillonella</i> sp.

1.4 - DIVERSIDADE BACTERIANA: SEQUENCIAMENTO DO GENE 16S rRNA DE CEPAS ISOLADAS POR CULTURA + CLONAGEM

O total de espécies detectadas pela clonagem bacteriana e sequenciamento de cepas isoladas por cultura de 10 casos encontra-se no **Quadro 2**. Foram identificadas 92 bactérias diferentes, numa média de 19 bactérias por canal.

As espécies mais frequentes foram: *Fusobacterium nucleatum*, e *Peptostreptococcus stomatis*, *Eubacterium* spp. presentes em 7 casos. *Parvimonas micra* *Prevotella buccae*, *Filifactor alocis* e *Dialister invisus* em 6 casos, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Lachnospiraceae* oral clone, *Phocaeicola abscessus* e *Prevotella nigrescens* em 5 casos.

Quanto ao requerimento gasoso e características da parede células, a maioria das bactérias detectadas eram anaeróbias gram-negativas (n=39). Vinte e três eram anaeróbias gram-positivas, 8 facultativas gram-negativas e 19 facultativas gram-positivas.

Quadro 2 – Espécies identificadas pelo sequenciamento e pela clonagem, e o número de espécies diferentes por caso (continua)

Caso	Isoladas por Cultura	Clonagem	Total de espécies
1	<i>Prevotella buccae</i> <i>Atopobium rimae</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Prevotella denticola</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Bifidobacterium dentium</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Parascardovia denticolens</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Prevotella multisacharivorax</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Bacillus licheniformis</i>	<i>Streptococcus intermedius</i> <i>Streptococcus constellatus</i> <i>Campylobacter gracilis</i> <i>Veillonella parvula</i> <i>Uncultured bacterium</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Prevotella loescheii</i> <i>Prevotella</i> sp. <i>Prevotella Tannerae</i> <i>Porphyromonas uenonis</i> <i>Olsenella profusa</i>	23

Quadro 2 – Espécies identificadas pelo sequenciamento e clonagem, e o número de espécies diferentes por caso (continuação)

Caso	Sequenciamento	Clonagem	Total de espécies
2	<i>Propionibacterium acidifaciens</i> <i>Olsenella</i> sp. <i>Scardovia inopinata</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Prevotella tannerae</i> <i>Porphyromonas uenonis</i> <i>Olsenella profusa</i>	<i>Eubacteriaceae</i> oral clone <i>Phocaeicola abscessus</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Solobacterium</i> sp. <i>Parvimonas micra</i> <i>Olsenella uli</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Prevotella buccae</i> <i>Prevotella</i> sp. <i>Prevotella denticola</i> <i>Eubacterium</i> sp. <i>Filifactor alocis</i> <i>Atopobium rimae</i> <i>Lachnospiraceae</i> oral clone <i>Firmicutes</i> oral clone <i>Fusobacterium nucleatum</i>	23
3	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Slackia exigua</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Prevotella oris</i> <i>Veillonella parvula</i> <i>Aggregatibacter aphrophilus</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Acinetobacter lwofii</i> <i>Actinomycetales bacterium</i> <i>Uncultured bacterium</i> <i>Paracoccus</i> sp. <i>Escherichia coli</i> <i>Micrococcus flavus</i> <i>Exiguobacterium mexicanum</i> <i>Uncultured Sphingomonas</i> sp. <i>Deinococcus</i> sp. oral clone <i>Bacteroidetes bacterium</i>	20

Quadro 2 – Espécies identificadas pelo sequenciamento e clonagem, e o número de espécies diferentes por caso (continuação)

Caso	Sequenciamento	Clonagem	Total de espécies
4	<i>Parvimonas micra</i> <i>Solobacterium moorei</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Actinomyces georgiae</i> <i>Prevotella tanneriae</i> <i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Parvimonas micra</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Lachnospiraceae</i> oral clone <i>Prevotella baroniae</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Eubacterium infirmum</i> <i>Prevotella oris</i> <i>Filifactor alocis</i> <i>Shuttleworthia satelles</i> <i>Solobacterium moorei</i> <i>Eubacterium minutum</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Uncultured Lachnospiraceae</i> <i>Eubacterium</i> sp. <i>Escherichia coli</i> <i>Porphyromonas endodontalis</i>	20
5	<i>Prevotella buccae</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Phocaeicola abscessus</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Slackia exigua</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Pyramidobacter pisolens</i> <i>Parvimonas micra</i>	<i>Prevotella oris</i> <i>Lachnospiraceae</i> oral clone <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Filifactor alocis</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Eubacterium infirmum</i> <i>Atopobium rimae</i> <i>Shuttleworthia satelles</i> <i>Eubacteriaceae</i> oral clone <i>Dialister pneumosintes</i> <i>Eubacterium minutum</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Prevotella denticola</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Veillonellaceae</i> bacterium <i>Phocaeicola abscessus</i> <i>Solobacterium moorei</i> <i>Uncultured Lachnospiraceae</i>	23

Quadro 2 – Espécies identificadas pelo sequenciamento e clonagem, e o número de espécies diferentes por caso (continuação)

Caso	Sequenciamento	Clonagem	Total de espécies
6	<i>Streptococcus mutans</i> <i>Prevotella buccae</i> <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> <i>Atopobium parvulum</i> <i>Veillonella díspar</i> <i>Prevotella oralis</i> <i>Prevotella oulorum</i> <i>Veillonella</i> sp.	<i>Streptococcus</i> sp. <i>Streptococcus mutans</i> <i>Prevotella oulorum</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Veillonellaceae bacterium</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus salivarius</i> <i>Uncultured bacterium</i> <i>Streptococcus mitis</i> <i>Veillonella díspar</i> <i>Lachnospiraceae oral clone</i>	15
7	<i>Prevotella nigrescens</i> <i>Prevotella buccae</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Prevotella</i> sp. <i>Dialister pneumosintes</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Fusobacterium</i> sp. <i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Catonella morbi</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Campylobacter</i> sp. <i>Eubacterium</i> sp. <i>Prevotella buccae</i> <i>Filifactor alocis</i> <i>Dialister pneumosintes</i> <i>Eubacteriaceae oral clone</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Prevotella</i> sp. <i>Peptostreptococcus stomatis</i>	17

Quadro 2 – Espécies identificadas pelo sequenciamento e clonagem, e o número de espécies diferentes por caso (continuação)

Caso	Sequenciamento	Clonagem	Total de espécies
8	<i>Filifactor alocis</i> <i>Solobacterium moorei</i> <i>Dialister pneumosintes</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Campylobacter rectus</i>	<i>Treponema denticola</i> <i>Filifactor alocis</i> <i>Uncultured Synergistes</i> sp. <i>Phocaeicola abscessus</i> <i>Dialister invisus</i> <i>Treponema socranskii</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Firmicutes</i> oral clone <i>Prevotella maculosa</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Enterobacter</i> sp. <i>Dialister pneumosintes</i> <i>Eubacterium yurii</i> <i>Eubacterium</i> sp. <i>Prevotella</i> sp. <i>Deferribacteres</i> sp. oral clone <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Bacteroidetes bacterium</i> <i>Lachnospiraceae</i> oral clone <i>Prevotella baroniae</i>	22
9	<i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Prevotella nigrescens</i> <i>Parvimonas</i> sp. <i>Prevotella buccae</i> <i>Solobacterium moorei</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Eubacterium</i> sp. <i>Lactobacillus cateniformis</i>	<i>Phocaeicola abscessus</i> <i>Clostridiales bacterium</i> <i>Peptostreptococcus stomatis</i> <i>Parvimonas micra</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Firmicutes</i> oral clone <i>Prevotella oris</i> <i>Solobacterium</i> sp. <i>Porphyromonas endodontalis</i> <i>Uncultured bacterium</i> <i>Bacteroidales</i> oral clone	17

Quadro 2 – Espécies identificadas pelo sequenciamento e clonagem, e o número de espécies diferentes por caso (conclusão)

Caso	Sequenciamento	Clonagem	Total de espécies
10	<i>Prevotella tannerae</i> <i>Prevotella marshii</i> <i>Prevotella baroniae</i> <i>Filifactor alocis</i> <i>Slackia exigua</i> <i>Eubacterium sp.</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Flexistipes-like sp. oral clone</i> <i>Treponema socranskii</i> <i>Phocaeicola abscessus</i> <i>Prevotella Tannerae</i> <i>Prevotella baroniae</i> <i>Prevotella marshii</i> <i>Uncultured Synergistes sp.</i> <i>Filifactor alocis</i> <i>Prevotella sp.</i> <i>Tannerella forsythia</i> <i>Eubacterium infirmum</i> <i>Synergistetes bacterium</i> <i>Treponema sp. oral clone</i>	16

O número de species diferentes por canal variou de 15 à 23. A maioria dela eram anaeróbias Gram-negativas (n=39), mas uma houve também a detecção de um significativo número de Gram-positivas. Todos os 10 casos apresentaram pelo menos uma espécie do gênero *Prevotella* (*P. baroniae*, *P. buccae*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. maculosa*, *P. marshii*, *P. multisacharivorax*, *P. nirescens*, *P. oralis*, *P. oris*, *P. oulorum* and *P. tannerae*). *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus stomatis* e *Eubacterium spp.* foram detectados em 7 casos; *Filifactor alocis*, *Dialister invisus*, *Prevotella buccae* e *Parvimonas micra* em 6 casos; *Phocaeicola abscessus*, *Prevotella nigrescens*, *Pseudoramibacter alactolicus*, *Porphyromonas spp.* e *Lachnospiraceae oral clone* in 5 cases. Nenhuma espécie foi encontrada nos 10 casos, e 54 bactérias foram detectadas em apenas 1 caso. Bactérias incultiváveis até o momento estavam presentes em 8 casos.

A maioria das bactérias detectadas pertencia ao filo *Firmicutes* (40,21%) e *Bacteroidetes* (21,73%), detectados nos 10 casos. *Fusobacteria* representou somente 3,26% das bactérias identificadas, porém esteve presente em 8 casos. O filo *Actinobacteria* representou 14,13%, *Proteobacteria* 10,86%, *Synergistetes* 5,43%, *Spirochaetes* 3,26% e *Deinococcus-Thermus* 1,08%.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Investigação da microbiota de canais radiculares infectados de dentes sintomáticos por cultura, clonagem e sequenciamento do gene 16S rRNA"**, protocolo nº 011/2007, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Letícia Maria Menezes Nóbrega e Rogério de Castilho Jacinto, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 12/03/2009.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Microbial investigation of infected root canals of symptomatic teeth using culture, clonal analysis and sequencing of the 16S rRNA gene"**, register number 011/2007, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Letícia Maria Menezes Nóbrega and Rogério de Castilho Jacinto, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at .

Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas
 Secretário
 CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP