

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba**

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E PROPEDEÚTICA CLÍNICA

**Nathália Dias**

**Genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos e  
tetraciclinas em amostras de caprinos com  
periodontite e saudáveis.**

Araçatuba – SP

2016

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba**

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E PROPEDEÚTICA CLÍNICA

**Nathália Dias**

**Genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos e  
tetraciclinas em amostras de caprinos com  
periodontite e saudáveis.**

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Prof. Dr. Elerson Gaetti Jardim Júnior  
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Cláudia Okamoto

**Araçatuba – SP**

**2016**

## *DEDICATÓRIA*

---

Aos meus pais,

Helena e Clayton, minha maior referência de ética, justiça e caridade, por terem sido meus pés e o meu chão por todas as vezes que eu não soube suportar a vida, vestindo a camisa dos meus sonhos e a alegria das minhas conquistas sempre.

À Deus,

Pelo presente de uma vida tão abençoada e por me direcionar por caminhos melhores do que esperei.

Aos meus irmãos,

Ana Paula e Guilherme, minha maior fonte de admiração, amizade e amor.

## *AGRADECIMENTOS*

---

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, pela oportunidade de uma formação sólida e bem fundamentada, abrindo caminhos para realização profissional.

Ao Departamento de Patologia e Propedêutica clínica, por me permitir fazer grandes amizades e contribuir com tantos ensinamentos.

Aos queridos professores com quem tive a oportunidade de aprender, o meu eterno respeito e admiração.

Aos professores Daniel Galera Bernabé e Letícia Helena Theodoro, por aceitarem fazer parte da banca examinadora do meu trabalho e por toda orientação concedida durante a minha trajetória acadêmica.

À minha coorientadora, Ana Cláudia Okamoto, exemplo de dedicação, por todo carinho, preocupação e cuidado.

Ao meu orientador e amigo, Elerson Gaetti Jardim Júnior, por me abrir novos caminhos e contribuir de forma essencial para o meu crescimento profissional, pessoal e espiritual durante todos esses anos de convivência.

Ao técnico do laboratório de Microbiologia, Robson Varlei Ranieri, pela grande amizade, paciência e por muitas vezes também ter sido meu professor.

Aos amigos que a faculdade me trouxe, Bruna Varsone, Ana Carolina Barboza, Leonardo Morais, Giseli Kayahara, Maurício Pereira, Mariana Martins, Lívia Valentim, João Pedro Limírio, Marcela Macedo, Morgana Fernandes e Luiza Tavares, minha eterna gratidão por fazer os meus dias tão mais coloridos, compartilhar amor, momentos difíceis e dividir os inúmeros momentos felizes.

## *EPÍGRAFE*

---

" A vida é marcada pela impermanência do tempo, das coisas, das pessoas. Sabemos que, em um momento ou outro, teremos que andar sozinhos, mas ainda assim levaremos conosco tudo o que permanece morando em nós. Que não seja permitida a saudade do que teve que partir levando um pedaço de nós; mas que permaneça a serenidade diante das esperas e a capacidade de regenerar-se quando um tombo nos faz em caquinhos "

**Fabíola Simões**

Dias, N. **Genes de resistência a  $\beta$ -lactâmicos e tetraciclinas em amostras de caprinos com periodontite e saudáveis.** 2016. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2016.

### Resumo

A periodontite em caprinos constitui uma enfermidade infecciosa com potencial debilitante. Está relacionada a diferentes grupos microbianos anaeróbios após a perda do equilíbrio ecológico no biofilme subgengival, por meio de um possível contato com concentrações subinibitórias de antimicrobianos produzidos por microrganismos no solo, o que torna mais provável a presença de microrganismos resistentes a essas drogas na microbiota bucal dos animais acometidos. O objetivo do estudo foi avaliar a ocorrência de marcadores de resistência aos antimicrobianos no biofilme subgengival de caprinos com periodontite e periodontalmente saudáveis. Os espécimes clínicos utilizados foram coletados do biofilme de 36 caprinos com periodontite e de 20 animais periodontalmente saudáveis. Após a extração do DNA microbiano, foi avaliada a presença dos genes *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *ermA* e *ermF* através da reação em cadeia da polimerase (PCR). As variáveis que apresentaram três ou mais categorias foram submetidas ao teste de Qui-quadrado e as possíveis associações entre os parâmetros estudados foram determinadas através do teste de correlações de Spearman. Os genes *bla* e *ermA* não foram detectados nos espécimes clínicos, enquanto os genes *ermF*, *tetM*, *tetQ* foram observados em 36,4%, 22,7% e 36,4% dos espécimes de animais com periodontite, respectivamente, mas não de animais saudáveis, o que se mostrou estatisticamente significativo. O gene *tetO* foi detectado em 36,4% dos espécimes de animais com periodontite e de 9,1% dos exemplares saudáveis. Os resultados permitiram a conclusão de que o biofilme de caprinos com periodontite apresenta maior frequência de detecção de determinados marcadores de resistência antimicrobianos.

**Palavras chave:** periodontite, ruminantes, bactérias anaeróbias, resistência microbiana a medicamentos.

Dias, N. **Resistance genes for  $\beta$ -lactams and tetracycline in datas of goats with periodontitis and periodontally healthy.** 2016. 31f. Trabalho de Conclusão de Curso – Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araçatuba, 2016.

### **Abstract**

Periodontitis is an infectious disease potentially debilitating in goats. It is associated with different anaerobic microbial groups after loss of the ecological balance in the biofilm possibly by contact with subinhibitory concentrations of antimicrobials produced by soil microorganisms, which enhance the probability of the presence of microorganisms resistant to these drugs in the oral microbiota of affected animals. The aim of the study was to evaluate the occurrence of antimicrobial resistance markers in the subgingival biofilm from goats with periodontitis and from periodontal healthy animals. Clinical specimens were collected from the biofilm of 36 goats with periodontitis and 20 periodontally healthy animals. After extraction of microbial DNA, it was evaluated the presence of genes *tetM*, *tetO*, *tetQ*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *ermA* and *ermF* by polymerase chain reaction (PCR). The variables with three or more categories were submitted to the Chi-Square test and the possible associations between the studied parameters were determined using the Spearman correlation test. The *bla* genes and *ermA* were not detected in clinical specimens, while genes *ermF*, *tetM*, *tetQ* were observed in 36.4%, 22.7% and 36.4% of the animals with periodontitis, respectively, but not in specimens from healthy animals, which was statistically significant. The gene *tetO* was detected in 36.4% of the specimens from animals with periodontitis and from 9.1% healthy specimens. The results allow the conclusion that the biofilm from goats with periodontitis has higher frequency detection of certain antimicrobial resistance markers.

Keywords: periodontitis, ruminants, anaerobic bacteria, microbial drug resistance.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Iniciadores específicos utilizados nos ensaios para detecção de genes de resistência.

Tabela 2 - Distribuição de marcadores de resistência a antimicrobianos em amostras de biofilme subgengival de caprinos com periodontite ou periodontalmente saudáveis.



## LISTA DE ABREVIATURAS

Prof – Professor

Profa – Professora

Dr – Doutor

Dra – Doutora

DNA - ácido desoxirribonucleico

PCR – Reação em cadeia da polimerase

mL - Mililitros

µL – Microlitros

xg – Força de centrifugação

AL – Tampão de lise

AW1 – Tampão de lavagem

AE – Tampão de eluição

*tet* – Gene de resistência às tetraciclinas

*bla* – Gene de resistência aos β-lactâmicos

*erm* – Gene de resistência aos macrolídeos

rRNA – RNA ribossômico

ESBLs - β-lactamases de espectro estendido

p – probabilidade de significância

IC – Intervalo de confiança

## Sumário

<b>1.Introdução</b> .....	<b>10</b>
<b>2.Objetivo</b> .....	<b>12</b>
<b>3.Materiais e métodos</b> .....	<b>13</b>
3.1. Espécimes Clínicos.	
3.2. Extração do DNA Microbiano.	
3.3. Detecção dos diferentes marcadores de resistência aos antimicrobianos	
3.4. Análise estatística	
<b>4.Resultados</b> .....	<b>16</b>
<b>5.Discussão</b> .....	<b>18</b>
<b>6.Conclusão</b> .....	<b>21</b>
<b>7.Referências</b> .....	<b>22</b>
<b>8.Anexos</b> .....	<b>30</b>

## 1.INTRODUÇÃO

As periodontites são doenças infecciosas associadas às alterações quantitativas e qualitativas no biofilme microbiano bucal, fenômeno conhecido como “disbiose” (BLASCO-BAQUE et al., 2016; WILLEMS et al., 2016), podendo interferir com as condições sistêmicas dos hospedeiros envolvidos através da invasão microbiana direta ou danos indiretos provocados pelo processo inflamatório persistente (KAMER et al., 2008; IGARI et al., 2014; BLASCO-BAQUE et al., 2016).

A despeito das peculiaridades clínicas e microbiológicas de cada espécie de hospedeiro, essas doenças vêm sendo caracterizadas em humanos (CHEN et al., 2015; HORZ et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016) e animais, destacando-se os primatas não humanos (GAETTI-JARDIM Jr et al., 2012), marsupiais (BIRD et al., 2002; MIKKELSEN et al., 2008), roedores (NAYAR et al., 2016), cães (RIGGIO et al., 2011; SENHORINHO et al., 2012; Di BELLO et al., 2014; WALLIS et al., 2015), gatos (DOLIESLAGER et al., 2013; PÉREZ-SALCEDO et al., 2015), bem como em espécies de importância econômica, como equinos (KENNEDY et al., 2016), bovinos (DÖBEREINER et al., 2000; TUNS & DAVID, 2010; BORSANELLI et al., 2015a; BORSANELLI et al., 2015b), ovinos (MCCOURTIE et al., 1990; DUNCAN et al., 2003) e caprinos (SUZUKI et al., 2006; CAMPELLO et al., 2015).

Deve-se destacar que as periodontites estão entre as principais enfermidades responsáveis por reduzir a produtividade do rebanho caprino e criar problemas de caráter sanitário e econômico, mas modesto é o conhecimento relativo a essas condições nesses animais (DÖBEREINER et al., 2000). Dados preliminares sugerem que o rebanho nacional, da ordem de 14 milhões de animais distribuídos em mais de 400 mil estabelecimentos agropecuários, ocupando o 18º lugar do “*ranking*” mundial de exportações no setor, pode estar severamente comprometido pelas doenças periodontais uma vez que praticamente inexistem levantamentos dessa natureza e os poucos dados disponíveis apontam nessa direção (CAMPELLO et al., 2015). Essas doenças, juntamente com as técnicas rudimentares utilizadas na maioria dos sistemas de criação e os problemas de ordem sanitária, contribuem

para a baixa produtividade da caprinocultura em várias regiões brasileiras (CORREIA et al., 2001; GUIMARÃES FILHO, 2006), inviabilizando a atividade em função de altas taxas de morbidade e mortalidade (IBGE, 2012).

Dentro do grupo dos ruminantes de importância econômica, o estudo da microbiota da periodontite de caprinos ainda é bastante insipiente (SUZUKI et al., 2006; CAMPELLO et al., 2015), o que contrasta com a magnitude dos danos provocados pela infecção ao aparelho estomatognático desses animais e com a importância social e econômica da prática da caprinocultura no Brasil, tanto na sua expressão familiar tradicional, ligada à pequena iniciativa, quanto na sua vertente comercial intensiva e de maior produtividade, principalmente em um cenário de maior demanda de produtos a ela relacionados, como artigos alimentícios e o couro (CORREIA et al., 2001; IBGE, 2012).

Os estudos sobre a etiologia das enfermidades periodontais, coletivamente, reforçam o papel de bactérias anaeróbias, principalmente os bastonetes Gram-negativos, como os gêneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Tannerella* e *Treponema* (DÖBEREINER et al., 2000; BIRD et al., 2002; Di BELLO et al., 2014; BORSANELLI et al., 2015a; BORSANELLI et al., 2015b; CHEN et al., 2015; HARRIS et al., 2015), na etiologia desses quadros infecciosos e inflamatórios periodontais, sugerindo o mesmo processo de disbiose observado em humanos.

Estudos preliminares indicam que o desequilíbrio da microbiota bucal desses animais estaria associado a efeitos de concentrações subinibitórias de antimicrobianos (HUDDLESTON et al., 1997; DÖBEREINER et al., 2000), nas gramíneas consumidas, capazes de aumentar significativamente a adesão celular dos bastonetes Gram-negativos anaeróbios (DUTRA et al., 1986; KOPP et al., 1996). Algumas condições parecem facilitar esse fenômeno, como a formação pastagens novas em solos ricos em matéria orgânica, facilitando a proliferação de estreptomicetos e outros grupos microbianos produtores de antibióticos (BALDANI et al., 1982; DÖBEREINER 1990; DUTRA et al., 1993; HUDLESTON et al., 1997).

Os antibióticos produzidos por esses microrganismos são encontrados principalmente em solos de regiões com alta prevalência de bovinos com periodontite (BALDANI et al., 1982; DÖBEREINER, 1990; DUTRA et al., 1993), mostrando correlação entre presença de antibióticos no solo e o desenvolvimento de periodontite nesses animais. Contudo, à exceção dos bovinos, pouco se conhece sobre esse fenômeno em outras espécies de ruminantes e sobre a presença de marcadores de resistência a drogas antimicrobianas na microbiota associada às periodontites em caprinos, animais bastante acometidos por elas (SUZUKI et al., 2006; CAMPELLO et al., 2015).

Como agravante, é possível que os genes de resistência a essas drogas antimicrobianas venham a ser transferidos horizontalmente para a microbiota humana, não apenas através do contato por meio do manejo desses animais, mas também pelo consumo dos produtos derivados, o que representa um risco adicional para a saúde humana e animal em uma época em que se busca a racionalização do uso de antimicrobianos em âmbito global, minimizando o abuso do seu emprego em diversas áreas, como em medicina veterinária e humana (TEUBER, 2001; PYÖRÄLÄ et al., 2014). Além desse aspecto, o estudo das periodontites nessas espécies também constitui oportunidade para melhor compreensão dessas enfermidades em humanos, uma vez que os modelos animais são bastante relevantes no estudo da patogênese das infecções periodontais (STRUILLOU et al., 2010).

## **2.OBJETIVO**

O presente estudo objetivou determinar a ocorrência de diferentes marcadores de resistência aos antimicrobianos no biofilme subgengival de caprinos com periodontite e de animais periodontalmente saudáveis.

### **3.MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP. Esse projeto apresenta-se de acordo com os princípios éticos de experimentação animal (Processo FOA 00731-2015).

#### **3.1. Espécimes Clínicos**

Os espécimes clínicos utilizados foram coletados do biofilme subgengival de 36 caprinos com periodontite e de 20 animais periodontalmente saudáveis de rebanhos indenes, de raças variadas, mantidos em criatórios no interior do Estado de São Paulo, sendo coletados por médicos veterinários que compõem o grupo de colaboradores do presente estudo. Os animais eram mantidos em pastagens comerciais e não receberam antibióticos ou quimioterápicos com atividade antimicrobiana nos três meses que precederam o estudo. Os procedimentos para a coleta dos espécimes clínicos do sulco gengival ou bolsas periodontais seguiram metodologia empregada anteriormente (GAETTI-JARDIM JR et al., 2012).

A remoção do biofilme supragengival foi realizada com gaze estéril e, em seguida, foram introduzidos cones de papel absorvente esterilizados no sulco gengival durante 60 segundos para coleta do biofilme subgengival. Quando presente, o conteúdo purulento de abscessos periodontais era coletado por meio de biópsia aspirativa. As amostras eram imediatamente acondicionadas em criotubos contendo 1 mL de água ultrapura esterilizada e armazenadas em nitrogênio líquido até a extração do DNA microbiano.

Todos os indicadores da presença de doença periodontal foram avaliados, conforme ficha clínica adaptada (Anexo), considerando-se as condições dos tecidos do periodonto de revestimento, nível de inserção conjuntiva e perda óssea. O exame clínico foi realizado segundo os parâmetros indicados por Gioso (2001). Adicionalmente foi verificada a presença ou ausência de retração gengival, sangramento gengival e halitose.

### 3.2. Extração do DNA Microbiano

As amostras clínicas foram armazenadas em criotubos com água Milli Q e extraídas através do “kit” QIAamp DNA (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Em cada amostra foi adicionada a 20µL de proteinase K, seguida de 200µL do tampão AL, mantendo-se a mistura a 56°C, por 10 minutos, adicionando-se, a seguir, etanol absoluto (200 µL) e centrifugando-se o conjunto através do “QIAamp Column”, a 6000xg, por 1 minuto.

A seguir, o filtrado foi desprezado e foram adicionados 500 µL do tampão AW1 repetindo-se a centrifugação, desprezando-se, novamente, o filtrado. Imediatamente, 500 µL do tampão AW2 foram acrescentados ao “QIAamp Column” e o conjunto foi centrifugado a 20.000xg por 3 minutos. O filtrado foi novamente desprezado e 200 µL de tampão AE foram adicionados ao “QIAamp Column”, por 1 minuto, antes de submeter o conjunto à centrifugação final a 6000xg, por 1 minuto. O filtrado foi mantido a -80°C. A concentração do DNA bacteriano foi determinada, para cada amostra, em espectrofotômetro (Beckman, Modelo DU-640), com leitura da absorbância (A260 nm).

### 3.3. Presença de diferentes marcadores de resistência aos antimicrobianos.

A presença de marcadores de resistência às tetraciclina e β-lactâmicos foi determinada nas amostras dos animais com periodontite e nos espécimes periodontalmente saudáveis. A presença dos marcadores de resistência às tetraciclina (*tetM*, *tetO* e *tetQ*) foi determinada como descrito por Ng et al. (2001) e Aminov et al. (2001). A presença do gene *ermA*, marcador de resistência aos macrolídeos (*ermA* e *ermF*), foi avaliada segundo Chen et al. (2007). A presença dos marcadores de resistência aos β-lactâmicos (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>) foi determinada segundo Belaouaj et al. (1994) e Henriques et al. (2006). A sequência dos iniciadores é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores específicos utilizados nos ensaios para detecção de genes de resistência.

<b>Alvo</b>	<b>Sequência dos Oligonucleotídeos 5'→3'</b>	<b>Amplicon (pb)</b>	<b>Temperatura de anelamento</b>
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	ATC GCT ACA TCC TGC TTG CCT TC CCA CAT AGA TCG CCG TGA AGA GG	806	60°C
<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	CAG TCG ATA GGA ACA GCA GTA GAC CAG ATC CTA CTC CTT	280	55°C
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	TAG TACG GAR AGT TTA TTG TAT ACC CCT TGG CGT ATC TAT AAT GTT GAC	310	55°C
<i>ermA</i>	CGA CAC AGC TTT GGT TGA AC AAY AGY AAA CCY AAA GCT C	332	55°C
<i>ermF</i>	CGA CAC AGC TTT GGT TGA AC GGA CCT ACC TCA TAG ACA AG	309	56°C
<i>tetM</i>	ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC	171	55°C
<i>tetO</i>	ACG GAR AGT TTA TTG TAT ACC TGG CGT ATC TAT AAT GTT GAC	171	60°C
<i>tet Q</i>	AGA ATC TGC TGT TTG CCA GTG CGG AGT GTC AAT GAT ATT GCA	169	60°C



### 3.4. Análise estatística

As variáveis que apresentaram três ou mais categorias foram submetidas a teste de Qui-quadrado, enquanto as existências de possíveis associações microbianas foram determinadas através do teste de correlações de Spearman.

## 4. RESULTADOS

Os resultados do presente estudo evidenciaram que as amostras clínicas de biofilme microbiano subgengival de caprinos pode albergar diferentes marcadores de resistência a drogas antimicrobianas amplamente utilizadas no tratamento das infecções humanas e animais.

Os genes associados à produção das  $\beta$ -lactamases de amplo espectro de ação, como os marcadores *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> não foram detectados, o mesmo ocorrendo com o gene *ermA*, ligado a resistência à eritromicina e outros macrolídeos.

A ocorrência dos genes *tetM* (Teste de Qui-quadrado,  $p= 0,018$ ) e *tetO* (Teste de Qui-quadrado,  $p= 0,026$ ), *tetQ* (Teste de Qui-quadrado,  $p= 0,018$ ) e *ermF* (Teste de Qui-quadrado,  $p= 0,018$ ) foi significativamente mais elevada entre os animais com periodontite do que entre caprinos periodontalmente saudáveis (Tabela 2). Observou-se também que os marcadores *tetM*, *tetQ* e *ermF* não foram encontrados em amostras de animais saudáveis.

A ocorrência de marcadores de resistência às tetraciclinas e macrolídeos nas mesmas amostras clínicas mostrou-se estatisticamente correlacionada (teste de Correlações de Spearman,  $IC=0,78$ ).

Tabela 2. Distribuição de marcadores de resistência a antimicrobianos em amostras de biofilme subgengival de caprinos com periodontite ou periodontalmente saudáveis.

Marcador de resistência	Ocorrência %	
	Animais periodontalmente saudáveis	Animais com periodontite
<i>ermF</i>	0,0	36,4
<i>tetM</i>	0,0	22,7
<i>tetO</i>	9,1	36,4
<i>tetQ</i>	0,0	36,4

## 5. DISCUSSÃO

A compreensão da patogênese das periodontites em ruminantes é bastante limitada, com poucos estudos sobre a participação de microrganismos específicos disponíveis (DÖBEREINER et al., 2000; DUNCAN et al., 2003; SUZUKI et al., 2006; TUNS & DAVID, 2010; BORSANELLI et al., 2015a; BORSANELLI et al., 2015b; CAMPELLO et al., 2015).

Segundo Huddleston et al. (1997) e Döbereiner et al. (2000), a presença de matéria orgânica abundante em determinados solos permite extensa proliferação de estreptomicetos, muitos dos quais são produtores de drogas antimicrobianas, como macrolídeos (OMURA et al., 1980) e tetraciclina (ASAGBRA et al., 2005), que poderiam produzir disbiose na microbiota bucal, modificando a composição do biofilme, produzindo danos aos tecidos periodontais, levando à perda precoce de dentes e enfraquecimento progressivo e pronunciado dos animais acometidos.

Não são conhecidos os mecanismos pelos quais a presença desses agentes antimicrobianos na cadeia alimentar dos ruminantes poderia produzir um desequilíbrio na microbiota bucal, particularmente na microbiota anaeróbia obrigatória, a qual está profundamente associada às infecções periodontais. Estudos iniciais evidenciaram que concentrações subinibitórias de diferentes antimicrobianos podem exacerbar a adesão celular dos bastonetes Gram-negativos anaeróbios (DUTRA et al., 1986; KOPP et al., 1996), outrora denominados coletivamente de “black pigmented *Bacteroides*” e hoje reclassificados nos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas*, de grande importância na periodontite de ruminantes (BORSANELLI et al., 2015a; BORSANELLI et al., 2015b) e reservatórios frequentes de genes de resistência a drogas antimicrobianas em humanos (VILLEDEU et al., 2004; TRIBLE et al., 2010).

Os animais da presente avaliação não receberam drogas antimicrobianas nos meses anteriores ao tratamento e eram animais adultos jovens com dentição permanente, mantidos sob condições controladas, para futuro emprego como reprodutores ou para abate, o que contrasta com a elevada frequência de detecção de genes de resistência a antimicrobianos

nas suas amostras clínicas (Tabela 2), o que sugere que a pressão seletiva sobre o biofilme possa estar sendo exercida por antimicrobianos em baixas concentrações na alimentação ou produzidos no ambiente em que os animais são mantidos.

As bases genéticas da produção de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro de atividade estão ligadas principalmente ao gene *bla*<sub>TEM</sub> (BIBBAL et al., 2007) e sua disseminação vem se mostrando alarmante, particularmente entre microrganismos entéricos. Entretanto, a introdução de novos agentes desse grupo de drogas tem levado à disseminação de diferentes genes e mutações que conferem níveis variados de resistência a essas drogas, sendo que em bactérias entéricas merece destaque a produção das  $\beta$ -lactamases de amplo espectro de ação, conhecidas pela sigla ESBLs em inglês. A grande maioria dos microrganismos produtores dessas  $\beta$ -lactamases apresenta os genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> (PITOUT et al., 2005).

Os genes associados à produção das  $\beta$ -lactamases de amplo espectro de ação, como os marcadores *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> não foram detectados. Esses genes e os marcadores de resistência às tetraciclinas são tipicamente observados em criações intensivas de animais para abate (HE et al., 2016; SHAMILA-SYUHADA et al., 2016) e podem ser transferidos horizontalmente para outros grupos microbianos (NIKOLICH et al., 1994). Esses dados sugerem que os principais microrganismos produtores dessas enzimas, os membros da família *Enterobacteriaceae*, não constituem parte significativa da microbiota subgengival de caprinos com ou sem periodontite (dados de ensaios do laboratório e não apresentados).

Entre os bastonetes Gram-negativos anaeróbios obrigatórios e cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos é bastante comum a resistência à eritromicina, o macrolídeo tradicionalmente mais utilizado, em comparação com a claritromicina e azitromicina, ou as lincosaminas (BAQUERO & REIG, 1992; KATSANDRI et al., 2006; KURIYAMA et al., 2007). Os mecanismos de resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas são bastante variados e essas drogas, embora estruturalmente não relacionadas, podem ter seus

mecanismos de ação bloqueados por marcadores de resistência comuns (ROBERTS, 2008). Dentre os genes de resistência a essas drogas, merece destaque os genes *erm*, embora mais de 60 diferentes marcadores de resistência tenham sido descritos (ZHANG et al., 2009).

A grande variedade de genes *erm* acaba por dificultar avaliações epidemiológicas sobre sua distribuição e disseminação, mas, de forma geral, os determinantes de resistência encontrados no ambiente externo não são os mesmos observados em microrganismos da microbiota residente ou em patógenos associados a infecções nosocomiais (ZHANG et al., 2009). Os genes *ermA* e *ermF* estão entre os mais frequentes marcadores de resistência (ROBERTS, 1999), como apresentado na Tabela 2, o gene *ermA* não foi detectado. Sua ocorrência é mais associada aos membros do gênero *Staphylococcus* e não é conhecida a prevalência desses cocos na microbiota bucal de caprinos, independentemente da condição bucal dos mesmos.

O gene *ermF* vem sendo observado em fusobactérias, as quais são muito frequentes em caprinos (CAMPELLO et al., 2015). Esses genes podem ser transferidos através de plasmídeos conjugativos e transposons (ROBERTS, 1999) e codificam para uma 23S rRNA adenina-N-6-metil-transferase, a qual é responsável pela metilação do 23S rRNA, levando a uma redução da afinidade do sítio ribossomal pelo antimicrobiano, estando bem distribuídos em microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos (HECHT, 2006; ROBERTS, 2008)

A resistência às tetraciclinas é amplamente disseminada e seus marcadores de resistência constituem elemento comumente encontrado em criações de porcos e aves, além de esgotos domésticos, cursos hídricos e nos solos (LYNNE et al., 2008; SRINAVASAN et al., 2008; KYSELKOVÁ et al., 2013).

Os marcadores genéticos mais comuns associados à resistência à tetraciclina são representados pelos genes *tet*, os quais têm sido divididos em genes que codificam para as proteínas de efluxo (responsáveis por exportar ativamente a droga que penetra no citoplasma bacteriano), representados pelos genes *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetG*, *tetI*, *tetK*, and *tetL*, e aqueles que protegem o ribossomo da ação da droga, como os genes *tetM*, *tetO* e *tetQ*,

enquanto o gene *tetX* codifica para uma proteína capaz de inativar o fármaco (ROBERTS, 1996).

Tem sido sugerido que a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, eritromicina e tetraciclina podem estar geneticamente interligadas, especialmente em anaeróbios estritos Gram-negativos (KURIYAMA et al., 2007). Os dados do presente estudo suportam parcialmente essa teoria, uma vez que a presença dos marcadores de resistência às tetraciclinas e macrolídeos se mostrou interligada, o que pode sugerir sua presença nos mesmos microrganismos.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados evidenciaram que o biofilme subgingival de caprinos com periodontite apresenta marcadores de resistência à tetraciclina e macrolídeos com uma frequência muito superior à observada com os animais periodontalmente saudáveis.

## 7. REFERENCIAS

1. AMINOV, R.I.; GARRIGUES-JEANJEAN, N.; MACKIE, R.I. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 67, p.22-32, 2001.
2. ASAGBRA, AE.; SANNI, A.I.; OYEWOLE, O..Solid-state fermentation production of tetracycline by *Streptomyces* strains using some agricultural wastes as substrate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.21, P.107–114, 2005.
3. BALDANI, J.L.; BALDANI, V.L.D.; XAVIER, D.F.; BODDEY, R.M.; DÖBEREINER, J. Efeito da calagem no número de actinomicetos e na porcentagem de bactérias resistentes à estreptomicina na rizosfera de milho, trigo e feijão. *Rev. Microbiol.*, v.13, p.250-263, 1982.

4. BAQUERO, F.; REIG, M. Resistance of anaerobic bacteria to antimicrobial agents in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v. 11, p. 1016-20, 1992.
5. BELAAOUAJ, A.; LAPOUMEROUILLIE, C.; CANIÇA, M.M.; VEDEL, G.; NÉVOT, P.; KRISHNAMOORTHY, R.; PAUL, G. Nucleotide sequences of the genes coding for the TEM-like  $\beta$ -lactamases IRT-1 and IRT-2 (formerly called TRI-1 and TRI-2). *FEMS Microbiol. Letters*, v.120, p.75-80, 1994.
6. BIBBAL, D.; DUPOUY, V.; FERRE, J. P.; TOUTAIN, P. L.; FAYET, O.; PRERE, M. F.; BOUSQUET-MELOU, A. Impact of three ampicillin dosage regimens on selection of ampicillin resistance in Enterobacteriaceae and excretion of blaTEM genes in swine feces. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73(15), p.4785-4790, 2007.
7. BIRD, P. S.; HUYNH, S.C.; DAVIS, D.; LOVE, D.N.; BLACKALL, L.L.; SEYMOUR, G.J. Oral disease in animals: The Australian perspective. Isolation and characterisation of black-pigmented bacteria from the oral cavity of marsupials. *Anaerobe*, v.8, p.79-87, 2002.
8. BLASCO-BAQUE, V.; GARIDOU, L.; POMIÉ, C.; ESCOULA, Q.; LOUBIERES, P.; LE GALL-DAVID, S.; AZALBERT, V. Periodontitis induced by Porphyromonas gingivalis drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *J. Gut*, v.0, p.1–14, 2016. doi:10.1136/gutjnl-2015-309897.
9. BORSANELLI, A.C.; GAETTI-JARDIM JR, E.; DÖBEREINER, J.; DUTRA, I.S. *Treponema denticola* in microflora of bovine periodontitis. *Pesq. Vet. Bras.* v.35, p.237-240, 2015b.
10. BORSANELLI, A.C.; GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E.; SCHWEITZER, C.M.; DÖBEREINER, J.; DUTRA, I.S. Presence of *Porphyromonas* and *Prevotella* species in the oral microflora of cattle with periodontitis. *Pesq. Vet. Bras.*, v.35, p.29-834, 2015a.
11. BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatísticas: Pecuária (rebanhos), 2012. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 abril. 2016.

12. CAMPELLO, P.; AGOSTINHO, S.; BORSANELLI, A.; GAETTI-JARDIM JR, E.; DUTRA, I. Ocorrência de abscesso periodontal em caprinos de leite. *Ars. Veterinaria*, v.3, p.76, 2015.
13. CORREIA, R.C.; MOREIRA, J.N.; ARAUJO, J.L.P.; RAMOS, C.H.S. Cadeia Produtiva de caprinos-ovinos no vale do rio Gavião: elementos para tomada de decisão. Petrolina. EMBRAPA semi-árido, Salvador, p.39, 2001.
14. DI BELLO, A.; BUONAVOGLIA, A.; FRANCHINI, D.; VALASTRO, C.; VENTRELLA, G.; GRECO, M. F.; CORRENTE, M. Periodontal disease associated with red complex bacteria in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v.55, p.160-163, 2014.
15. DÖBEREINER, J. Zur Ätiologie der Cara inchada, einer parodontalen. Erkrankung der Jungrinder in Brasilien. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* v.97, p.482-490, 1990.
16. DÖBEREINER, J.; DUTRA I.S.; ROSA I.V.; BLOBEL, H. "Cara inchada" of cattle, an infectious, apparently soil antibiotics-dependent periodontitis in Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* v.20, p.47-64, 2000.
17. DOLIESLAGER, S.M.; BENNETT, D.; JOHNSTON, N.; RIGGIO, M.P. Novel bacterial phylotypes associated with the healthy feline oral cavity and feline chronic gingivostomatitis. *Research in veterinary science*, v.94, p.428-432, 2013.
18. DUNCAN, W.J.; PERSSON, G.R.; SIMS, T.J.; BRAHAM, P.; PACK, A.R.C.; PAGE, R.C. Ovine periodontitis as a potential model for periodontal studies. *J. Clin. Periodontol.*, v.30, p.63-72, 2003.
19. DUTRA, I.S.; KANOE, M. & BLOBEL, H. Atividades enzimáticas e endotóxicas de bactérias isoladas de lesões peridentárias da "cara inchada" dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.*, v.6, p.59-63, 1986.
20. DUTRA, I.S.; MATSUMOTO, T. & DOBEREINER, J. Surtos de periodontite em bezerros ("cara inchada") associados ao manejo do solo. *Pesq. Vet. Bras.*, v.13, p.1-4, 1993.
21. GAETTI-JARDIM JR, E.; MONTI, L.M.; CIESIELSKI, F.I.N.; GAETTI-JARDIM, E.C.; OKAMOTO, A.C.; SCHWEITZER, C.M. & AVILA-CAMPOS, M.J. Subgingival microbiota



- from *Cebus apella* (capuchin monkey) with different periodontal conditions. *Anaerobe*, v.18, p.263-269, 2012.
22. GIOSO, M. A. Odontologia veterinária para o clínico de pequenos animais. Rev. São Paulo: Vet. e Zootec., 4<sup>a</sup> ed., p. 1-7, 2001.
  23. GONÇALVES, C.; SOARES, G.M.S.; FAVERI, M.; PEREZ-CHAPARRO, P.J.; LOBAO, E.; FIGUEIREDO, L.C.; FERES, M. Association of three putative periodontal pathogens with chronic periodontitis in Brazilian subjects. *Journal of Applied Oral Science*, v.24, p.181-185, 2016.
  24. GUIMARÃES FILHO, C. Situação atual e perspectivas da caprinocultura no Vale do São Francisco. In: Congresso Nordestino de produção animal, v.4, p.14, 2006. Petrolina-PE: SNPA. CD-ROM.
  25. HARRIS, S.; CROFT, J.; O'FLYNN, C.; DEUSCH, O.; COLYER, A.; ALLSOPP, J.; MILELLA, L.; DAVIS, I. J. A pyrosequencing investigation of differences in the feline subgingival microbiota in health, gingivitis and mild periodontitis. *PloS one*, v.10, e0136986, 2015.
  26. HE, L. Y., YING, G. G., LIU, Y. S., SU, H. C., CHEN, J., LIU, S. S., & ZHAO, J. L.. Discharge of swine wastes risks water quality and food safety: Antibiotics and antibiotic resistance genes from swine sources to the receiving environments. *Environment international*, v. 92, p. 210-219, 2016.
  27. HECHT, DAVID W. Anaerobes: antibiotic resistance, clinical significance, and the role of susceptibility testing. *Anaerobe*, v. 12, n. 3, p. 115-121, 2006.
  28. HENRIQUES, I.S.; FONSECA, F.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M.J.; CORREIA, A. Occurrence and diversity of integrons and  $\beta$ -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. *Res. Microbiol.*, v. 157, p. 938-47, 2006.
  29. HORZ, H.P.; ROBERTZ, N.; VIANNA, M.E.; HENNE, K.; CONRADS, G. Relationship between methanogenic archaea and subgingival microbial complexes in human periodontitis. *Anaerobe*, v. 35, p. 10-12, 2015.

30. HUDDLESTON A.S.; CRESSWELL, N.; NEVES, M.C.P.; BERINGER, J.E.; BAUMBERG, S.; THOMAS, D.I.; WELLINGTON, E.M.H. Molecular detection of streptomycin producing streptomycetes in Brazilian soils. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.63, p.1288-1297, 1997.
31. IGARI, K.; KUDO, T.; TOYOFUKU, T.; INOUE, Y.; IWAI, T. Association between periodontitis and the development of systemic diseases. *Oral Biol. Dent.*, v. 2, 2014. doi: 10.7243/2053-5775-2-4.  
  
Intra-genomic heterogeneity in 16S rRNA genes in strictly anaerobic clinical isolates from periodontal abscesses. *PloS one*, v.10: e0130265, 2015.
32. KAMER, A.R.; CRAIG, R.G.; DASANAYAKE, A.P.; BRYNS, M.; GLODZIK-SOBANSKA, L.; DE LEON, M.J. Inflammation and Alzheimer's disease: possible role of periodontal diseases. *Alzheimer's & Dementia*, v.4, p.242-250, 2008.
33. KATSANDRI, A.. In vitro activities of tigecycline against recently isolated Gram-negative anaerobic bacteria in Greece, including metronidazole-resistant strains. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*, p. 55, p. 231-6, 2006.
34. KENNEDY, R.S.; DIXON, P.M. The aetiopathogenesis of equine periodontal disease—a fresh perspective. *Equine Veterinary Education*, 2016.
35. KOPP, P.A.; DUTRA, I.S.; DOBEREINER, J.; SCHMITT, M.; GRASSMANN, B. & BLOBEL, H. Estreptomicina aumenta a aderência em células epiteliais de *Bacteroides melaninogenicus* associado às lesões peridentárias da cara inchada dos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* v.16, p.53-57, 1996.
36. KURIYAMA, T., WILLIAMS, D.W.; YANAGISAWA, M.; IWAHARA, K.; SHIMIZU, C.; NAKAGAWA, K.; KARASAWA, T.. Antimicrobial susceptibility of 800 anaerobic isolates from patients with dentoalveolar infection to 13 oral antibiotics. *Oral Microbiol. Immunol.*, v. 22, p. 285-8, 2007.
37. KYSELKOVÁ, M., JIROUT, J., CHRONÁKOVÁ, A., VRCHOTOVÁ, N., BRADLEY, R., SCHITT, H., & ELHOTTOVÁ, D.. Cow excrements enhance the occurrence of tetracycline

- resistance genes in soil regardless of their oxytetracycline content. *Chemosphere*, v.93(10), p.2413-2418, 2013.
38. LYNNE, A. M.; RHODS-CLARK, B. S.; BLIVEN, K.; ZHAO, S.; FOLEY, S. L.. Antimicrobial resistance genes associated with *Salmonella enterica* serovar Newport isolates from food animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 52(1), p. 353-356, 2008.
39. McCOURTIE, J.; POXTON, I.R.; BROWN, R.; WHITTAKER, C.R.; SPENCE, J.A.; AITCHISON, G.U. A Longitudinal Study of the Cultivable Subgingival Bacteria Isolated from Sheep During the Development of Broken Mouth Periodontitis. *Journal of Medical Microbiol.*, v.31, p. 275-283, 1990.
40. MIKKELSEN, D.; MILINOVICH, G.J.; BURRELL, P.C.; HUYNH, S.C.; PETTETT, L.M.; BLACKALL, L.L.; TROTT, D.J. & BIRD, P.S. Phylogenetic analysis of *Porphyromonas* species isolated from the oral cavity of Australian marsupials. *Environ. Microbiol.*, v.10, p.2425-2432, 2008.
41. NAYAR, G.; GAUNA, A.; CUKKAPALLI, S.; VELSKO, I.; KESAVALU, L.; CHA, S. Polymicrobial infection alter inflammatory microRNA in rat salivary glands during periodontal disease. *Anaerobe*, v.38, p.70-75, 2016.
42. NG, L-K.; MARTIN, I.; ALFA, M.; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline-resistant genes. *Mol. Cell. Probes*, v. 15, p. 209-15, 2001.
43. NIKOLICH, M. P., HONG, G., SHOEMAKER, N. B., & SALYERS, A. A.. Evidence for natural horizontal transfer of tetQ between bacteria that normally colonize humans and bacteria that normally colonize livestock. *Applied and Environmental Microbiology*, v.60(9), p.3255-3260, 1994.
44. OMURA, S.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, Y.; IWAI, Y. Stimulation of the production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. *J. Antibiotics*, v. XXXIII, p. 1568-9, 1980.
45. PÉREZ-SALCEDO, L.; LAGUNA, E.; SANCHEZ, M.C.; MARÍN, M.J.; O'CONNOR, A.; GONZÁLEZ, I.; SANZ, M.; HERREA, D. Molecular identification of black-pigmented

- bacteria from subgingival samples of cats suffering from periodontal disease. *J. Small Anim. Pract.*, v.56, p.270-275, 2015.
46. PITOUT, J. D. D. et al. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in the community. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 56, p. 52-59, 2005.
47. PYÖRÄLÄ, S.; BAPTISTE, K.E.; CATRY, B.; VAN DUJKEREN, E.; GREKO, C.; MORENO, M.A.; POMBA, M.C.M.F.; RANTALA, M.; RUŽAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E.J.; TORREN-EDO, J.; TÖRNEKE, K. Macrolides and lincosamides in cattle and pigs: use and development of antimicrobial resistance. *Vet J.*, v. 200, p. 230 - 239, 2014.
48. RIGGIO, M.P.; LENNON, A.; TAYLOR, D.J.; BENNET, D. Molecular identification of bacteria associated with canine periodontal disease. *Vet. Microbiol.*, v.150, p.394-400, 2011.
49. ROBERTS, M. C. et al. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide streptogramin B antibiotic resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 43, p. 2823–30, 1999.
50. ROBERTS, M. C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiol. Rev.*, v. 19, 1-24, 1996.
51. ROBERTS, M. C. Update on macrolide-lincosamide-streptogramin, ketolide, and oxazolidinone resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, v. 282, p. 147-59, 2008.
52. SENHORINHO, GN.; NAKANO, V.; LIU, C.; SONG, Y.; FINEGOLD, SM.; AVILA-CAMPOS, MJ. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Porphyromonas* spp. and *Fusobacterium* spp. in dogs with and without periodontitis. *Anaerobe*, v.18, p.381-385, 2012.
53. SHAMILA SYUHADA, A. K., RUSUL, G., WAN-NADIAH, W. A., & CHUAH, L. O.. Prevalence and Antibiotics Resistance of *Staphylococcus aureus* Isolates Isolated from

- Raw Milk Obtained from Small-Scale Dairy Farms in Penang, Malaysia. *Pakistan Veterinary Journal*, v.36(1), p.98-102, 2016.
54. SRINAVASAN, V.; NAM, HM.; SAWANT, A.A.; HEADRICK, S.I.; NGUYEN, L.T., OLIVER, S.P. Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils. *Microb Ecol* v.55, p.184–193, 2008.
55. STRUILLLOU, X.; BOUTIGNY, H.; SOUEIDAN, A.; LAYROLLE, P. Experimental animal models in periodontology: a review. *The open dentistry journal*, v.4, p.37-47, 2010.
56. SUZUKI, S.; MITANI, A.; KOYASU, K.; ODA, S-I.; YOSHINARI, N.; FUKUDA, M.; HANAMURA, H.; NAKAGAKI, H.; NOGUCHI, T. A Model of spontaneous periodontitis in the miniature goat. *Journal Periodontol.*, v. 77, n. 5, p. 847- 855, 2006.
57. TEUBER, M. Veterinary use and antibiotic resistance. *Cur. Opin Microbiol.*, v. 4, p. 493-499, 2001.
58. TRIBBLE GD, GARZA JJ, YEUNG VL, et al. Genetic analysis of mobile tetQ elements in oral *Prevotella* species. *Anaerobe*; v.16, p.604–9, 2010.
59. TUNS, S.; DAVID, C. Oral bacterial flora in cattle with dental calculus and periodontitis (preliminary results). *Lucrari Științifice medicina veterinară*, v.XLIII, p. 299-303, 2010.
60. VILLEDIEU A, DIAZ-TORRES ML, ROBERTS AP, et al. Genetic basis of erythromycin resistance in oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* v.48, p.2298–301, 2004.
61. WALLIS, C.; MARSHALL, M.; COLYER, A.; O'FIYNN, C.; DEUSCH, O.; HARRIS, S. A longitudinal assessment of changes in bacterial community composition associated with the development of periodontal disease in dogs. *Vet. Microbiol.*, v.181, p.271-282, 2015.
62. WILLEMS, H. M.; Xu, Z.; Peters, B.M. Polymicrobial biofilm studies: from basic science to biofilm control. *Cur. Oral Health Reports*, v. 3, p. 36-44, 2016.
63. ZHANG, X. X. et al. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 82, p. 397-414, 2009.

8.ANEXOS



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
 Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
 Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal  
 Laboratório de Enfermidades Infecciosas dos Animais

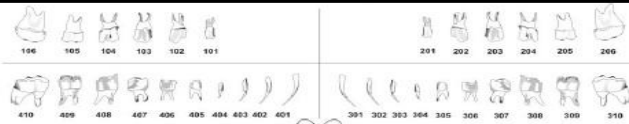


FICHA DE EXAME CLÍNICO DE CAPRINOS

Propriedade:			
Proprietário:			
Município:	Estado:		Data:
Sit. Epidemiológica:	Indene	Endêmica	Epidêmica
Nº de Animais:	Nº Examinados:	Prevalência:	Obs:

Número:	Idade:	Sexo:	Raça:
Assimetria de Cabeça:	Abaulamento:		Linfonodos:
Oclusão:	Halitose	Queilite	Abscessos
Saudável:	Gengivite	Periodontite superficial	Periodont. profunda

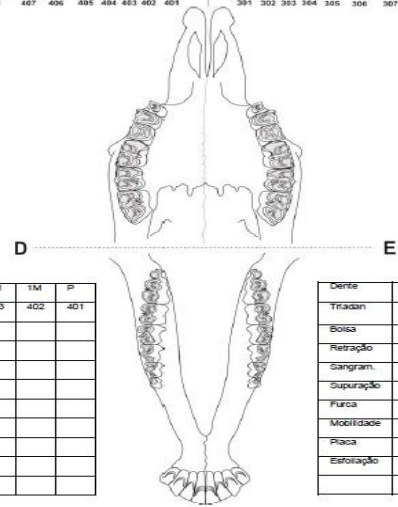
Esfoliação (E)  
 Bolsa Periodontal (BP) mm  
 Cálculo (C), grau I, II, III  
 Cárie (Ca)  
 Erosão (ER)  
 Exp. de Furca (EF), S/N



Exposição de Polpa (EP)  
 Fratura Dental (FD)  
 Mobilidade (MD), S/N  
 Placa (P), grau I, II, III  
 Retração Gingival (RG) mm

Dente:	M3	M2	M1	PM3	PM2	PM1
Triadan	105	105	104	103	102	101
Bolsa						
Retração						
Sangram.						
Supuração						
Furca						
Mobilidade						
Placa						
Esfoliação						

Dente:	PM1	PM2	PM3	M1	M2	M3
Triadan	201	202	203	204	205	206
Bolsa						
Retração						
Sangram.						
Supuração						
Furca						
Mobilidade						
Placa						
Esfoliação						



Dente	M3	M2	M1	PM3	PM2	PM1	C	2M	1M	P
Triadan	410	409	408	407	406	405	404	403	402	401
Bolsa										
Retração										
Sangram.										
Supuração										
Furca										
Mobilidade										
Placa										
Esfoliação										

Dente	P	1M	2M	C	PM1	PM2	PM3	M1	M2	M3
Triadan	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310
Bolsa										
Retração										
Sangram.										
Supuração										
Furca										
Mobilidade										
Placa										
Esfoliação										

Até 1 ano: Dentição de leite  
 1 a 1,5 anos: Subst. 2 pinças  
 1,5 a 2 anos: subst. 1º médios  
 2,5 a 3 anos: subst. 2º médios  
 3,5 a 4 anos: subst. cantos  
 (até 5 anos: boca cheia)

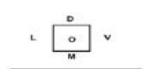
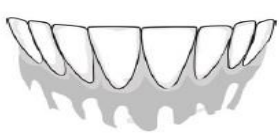


Figura 1: Odontograma utilizado nos exames clínicos dos caprinos.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Identificação da microbiota subgingival associada à doença periodontal em caprinos**", Processo FOA nº 00731-2015, sob responsabilidade de Iveraldo dos Santos Dutra apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 09 de Dezembro de 2015.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 01 de Novembro de 2016.

**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 01 de Dezembro de 2016.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**Identification of microbiota subgingival associated with periodontal disease in goats**", Protocol FOA nº 00731-2015, under the supervision of Iveraldo dos Santos Dutra presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on December 09, 2015.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** November 01, 2016.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** December 01, 2016.

**Profa. Adj. Maria Cristina Rosifini Alves Rezende**  
Vice-Coordenadora da CEUA  
CEUA Vice-Coordinator