

COMPARAÇÃO ENTRE TESTE BIOQUÍMICO CLÁSSICO E O MÉTODO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA IDENTIFICAÇÃO DE ESTIRPES DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLADAS DA CAVIDADE ORAL

Comparison between biochemist classic test and the Polymerase Chain Reaction (PCR) for identification of *Enterococcus faecalis* from the oral cavity

¹Professora da disciplina de Biologia Celular e Molecular da Universidade Sagrado Coração – Bauru – São Paulo

²Professor da disciplina de Microbiologia Médica e Clínica da Universidade Sagrado Coração – Bauru – São Paulo

³Bióloga graduada pela Universidade Sagrado Coração – Bauru – São Paulo

⁴Professor do departamento de Dentística, Endodontia e Materiais Odontológicos da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP

⁵Graduanda em Odontologia pela Universidade Sagrado Coração – Bauru – São Paulo.

⁶Professor de Endodontia da Universidade Sagrado Coração – Bauru – São Paulo

Adriana Terezinha de Mattias Franco¹

Paulo Henrique Weckwerth²

Gabriela Casaroto³

Marco Antonio Húngaro Duarte⁴

Natália Villas Bôas Weckwerth⁵

Geraldo Marco Rosa Júnior²

Rodrigo Ricci Vivan⁶

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

Resumo

Introdução: O gênero *Enterococcus* são habitantes normais do trato gastrointestinal e em menor proporção da vagina e uretra masculina. Tornaram-se importantes agentes de doenças humanas devido

Recebido em: 23/10/2012

Aceito em: 28/12/2012

principalmente à sua elevada resistência aos agentes antimicrobianos e seus inúmeros fatores de virulência. **Objetivo:** comparar dois métodos laboratoriais utilizados na identificação de 60 estirpes de *Enterococcus* coletados da cavidade bucal. Foi realizada a identificação das linhagens por um esquema bioquímico clássico baseado nas características fenotípicas e pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Assim, colônias com características de isolamento próprias de *Enterococcus* sobre a superfície do M-Enterococcus ágar, foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: produção de catalase, hidrólise da esculina, tolerância ao cloreto de sódio a 6,5%, fermentação do manitol, fermentação da arabinose, fermentação do sorbitol, desaminação da arginina, verificação da motilidade e produção de pigmento. **Resultados e Discussão:** os resultados dos testes foram interpretados e comparados com características fenotípicas de identificação de *Enterococcus*. A técnica de PCR foi realizada nessa mesma população de microrganismos. Pode-se observar que os testes bioquímicos clássicos identificaram todas as estirpes isoladas como sendo da espécie *E. faecalis*, enquanto a técnica de PCR revelou que 10 estirpes não pertenciam a espécie pesquisada. A análise estatística pelo método de Fisher revelou diferença significativa entre a série bioquímica e o método da PCR ($p < 0,05$). **Conclusões:** a coleção de linhagens de *Enterococcus* isoladas foram identificadas como *E. faecalis* através de um esquema bioquímico tradicional, baseando-se em suas características fenotípicas. Pela técnica da PCR 10 estirpes da coleção não foram identificadas como *E. faecalis*, revelando diferenças em suas características genotípicas.

Palavras-chave: *Enterococcus faecalis*. Identificação. Esquema bioquímico. Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

Introduction: The genus *Enterococcus* are normal inhabitants of the gastrointestinal tract and to a lesser extent the vagina and male urethra. They become important agents of human diseases mainly due to its high resistance to antimicrobial agents and its many virulence factors **Objective:** The aim of this study was to compare two laboratory methods used to identify 60 strains of *Enterococcus* collected from the oral cavity. The strains were identified through a conventional biochemical scheme based on phenotypic properties and by the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. Colonies with insulation characteristics pertaining to *Enterococcus* on the

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

surface of M-Enterococcus agar, were subjected to the following biochemical tests: production of catalase, esculin hydrolysis, 6.5% sodium chloride tolerance, mannitol fermentation, arabinose fermentation, sorbitol fermentation, arginine deamination, motility assay and pigment production. Results and Discussion: The results were interpreted and compared with phenotypic identification of Enterococcus. The PCR technique was performed in this same population of microorganisms. The conventional biochemical tests identified all the isolates as being E. faecalis, while the PCR technique showed that 10 strains did not belong to the species studied. After statistical analysis using the Fisher's method, the research showed, in a significant way, that the conventional biochemical tests were more efficient for the identification of E. faecalis compared to the PCR (p <0.05). Conclusions: the collection of strains of Enterococcus isolates were identified as E. faecalis through a traditional biochemical scheme, based on the phenotypic characteristics. By PCR test collection of 10 strains were not identified as E. faecalis revealing differences in their genotypic characteristics.

Key words: *Enterococcus faecalis. Identification. Biochemical scheme. Polymerase Chain Reaction.*

INTRODUÇÃO

O gênero *Enterococcus* inclui os enterococos clássicos previamente classificados como estreptococos do grupo D. São habitantes normais do trato gastrointestinal e em menor proporção da vagina e uretra masculina (KONEMAN *et al.*, 2001). Tornaram-se importantes agentes de doenças humanas devido principalmente à sua elevada resistência aos agentes antimicrobianos e seus inúmeros fatores de virulência recentemente mais estudados (KAYAOGLU & ØRSTAVICK, 2004).

São cocos Gram positivos, arranjados aos pares ou em cadeias curtas, sendo dificilmente diferenciados microscopicamente de alguns estreptococos. São anaeróbios facultativos e crescem em temperatura de 35°C sobre a superfície de ágar sangue como colônias tipicamente gama-hemolíticas e sobre a superfície do ágar M-*Enterococcus* como colônias puntiformes de cor vermelho escuro até arroxeadas. São distinguidos de bactérias do gênero *Staphylococcus* pela incapacidade de produção de catalase (MURRAY *et al.*, 1998).

Seus fatores de virulência têm sido amplamente estudados. Produzem citolisinas com atividade sobre hemácias humanas, ovinas e de cavalo. A substância de agregação é uma proteína codificada por plasmídeos responsável pela aglutinação dos microrganismos para facilitar a troca entre plasmídeos. As estirpes de *E. faecalis* produzem feromonas, pequenos peptídeos capazes de amplificar a transferência de DNA plasmidial por estirpes em processo conjugativo e também de amplificar a resposta inflamatória durante o processo infeccioso (KAYAOGLU & ØRSTAVICK, 2004).

O ácido lipoteicoico é, além de adesina, um importante fator de virulência por induzir à produção do fator de necrose tumoral (TNF), modulando de forma agressiva a resposta imune. Produzem várias enzimas extracelulares como gelatinase e hialuronidase (KAYAOGLU & ØRSTAVICK, 2004).

O *E. faecalis* causa infecções complicadas do trato urinário, bacteremia, endocardite, infecções pélvicas, sepse neonatal e mais raramente meningites (KONEMAN *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 1998). Embora seja uma espécie presente nos processos infecciosos gerais humanos, sua etiopatogenia nos processos infecciosos da cavidade oral vem sendo amplamente discutida.

Esta bactéria tem demonstrado habilidade para sobreviver sozinha no interior do canal radicular sem o suporte de outras bactérias. *E. faecalis* foi isolado em 38% dos dentes que apresentaram microrganismos recuperáveis, sugerindo que este é um importante agente no insucesso endodôntico. O fato do *E. faecalis* estar ausente ou em pequeno número em canais sem tratamento endodôntico, indica que essa bactéria pode penetrar no interior do canal durante o tratamento, sobreviver ao tratamento antimicrobiano e permanecer após tratamento endodôntico (FABRICIUS *et al.*, 1982).

O *E. faecalis* está presente em canais radiculares não tratados endodônticamente e, quando presente, usualmente compõem uma pequena porção da microbiota do canal radicular. O *E. faecalis* parece ter alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento e este é um dos poucos microrganismos que tem mostrado *in vitro* resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio (WEIGER *et al.*, 1995).

A maioria das espécies de *Enterococcus* hidrolisa a esculina na presença de bile a 40% e crescem em caldo de cloreto de sódio a 6,5% (WINN JÚNIOR *et al.*, 2008).

Apesar de *E. faecalis* e *E. faecium* serem as espécies isoladas com mais frequência de amostras clínicas, a incidência de outras espécies e o seu papel em processos mórbidos específicos não são conhecidos (WINN JÚNIOR *et al.*, 2008).

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. SALUSVITA, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

As espécies de *Enterococcus* podem ser identificadas rotineiramente através de esquemas, empregando testes convencionais baseados em características fenotípicas que permitem separar estes microrganismos em diferentes espécies de importância médica (MANERO; BLANCH, 1999; FACKLAM; COLLINS, 1989). Os enterococos crescem bem em ágar sangue e meios seletivos como o M-Enterococcus ágar. Em ágar sangue a maioria das cepas são gama-hemolíticas (não hemolíticas) ou alfa-hemolíticas (parcialmente hemolíticas) (WINN JÚNIOR *et al.*, 2008).

A identificação dos enterococos até nível de espécie é frequentemente útil e, algumas vezes, crucial para o tratamento apropriado do paciente e para fins epidemiológicos e de controle de infecção (WINN JÚNIOR *et al.*, 2008).

A maioria das espécies de *Enterococcus* hidrolisam a esculina na presença de bile a 40% e crescem em caldo de cloreto de sódio a 6,5% (WINN JÚNIOR *et al.*, 2008).

Porém, a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, chamada de forma simplificada por PCR, tem sido muito aplicada para identificação de espécies bacterianas a partir de amostras clínicas diversas, por apresentar algumas vantagens como praticidade, rapidez, simplicidade, tempo ilimitado para análise, elevada especificidade e elevada sensibilidade (SIQUEIRA JUNIOR; ROÇAS, 2005).

A comparação entre os diferentes métodos a partir de culturas bacterianas pode revelar qual dos métodos pode ser aplicado com sensibilidade para identificação precisa do microrganismo, contribuindo para estudos epidemiológicos e etiológicos de infecções diversas.

Não há na literatura pertinentes trabalhos que demonstrem qual o método mais específico e sensível para identificar essa espécie de grande importância na Endodontia. Assim, o objetivo da pesquisa foi comparar um método bioquímico clássico de identificação com o método da PCR.

OBJETIVOS

O objetivo da pesquisa foi comparar um método bioquímico clássico de identificação de *E. faecalis* com o método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

MATERIAL E MÉTODO

Linhagens bacterianas

As linhagens bacterianas usadas nesta pesquisa foram isoladas da cavidade oral de pacientes atendidos na Clínica de Endodontia da Universidade Sagrado Coração (USC), durante procedimentos clínicos. As cepas foram cultivadas em meio M-Enterococcus ágar, seletivo para estirpes de *Enterococcus*, e mantidas armazenadas em bacterioteca no laboratório de Microbiologia da USC.

Ativação das estirpes

Antes dos testes bioquímicos e do teste de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), as estirpes precisaram ser ativadas em meio de cultura. Para isso, cada amostra foi semeada novamente sobre a superfície do meio M-Enterococcus ágar que foi incubado a 36°C por 18 a 24 horas. O crescimento colonial com característica de *Enterococcus* foi observado na superfície do meio, ou seja, colônias de cor vermelho púrpura, puntiformes e pequenas.

Testes bioquímicos de identificação

Foram utilizados testes bioquímicos para a identificação de *Enterococcus* propostos por Winn Júnior *et al.* (2008).

Assim, colônias com características de isolamento próprias de *Enterococcus* sobre a superfície do M-Enterococcus ágar, foram submetidas aos seguintes testes bioquímicos: produção de catalase, hidrólise da esculina, tolerância ao cloreto de sódio a 6,5%, fermentação do manitol, fermentação da arabinose, fermentação do sorbitol, desaminação da arginina, teste da motilidade e produção de pigmento. Os resultados dos testes foram interpretados e comparados com características fenotípicas de identificação de *Enterococcus* segundo Winn Júnior *et al.* (2008).

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

FRANCO, Adriana
Terezinha de Mattias
et al. Comparação
entre teste bioquímico
clássico e o método da
reação em cadeia da
Polimerase (PCR) para
identificação de estirpes
de *Enterococcus faecalis*
isoladas da cavidade
oral. *SALUSVITA*, Bauru,
v. 31, n. 3, p. 191-202,
2012.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Extração do DNA

Colônias puras da superfície das placas foram coletadas e colocadas nos criotubos plásticos onde foram acrescentados 100µL de TAS (50mM Tris HCL pH 8.0; 50mM EDTA; 150mM NaCl) que serve para manter o pH da solução; 10µL de SDS 10 % (Sodium Dodecyl Sulfate) para lavar as células e 2µL de proteinase K. Após a adição dos reagentes, os tubos permaneceram em banho-maria por uma hora a 60° C. Posteriormente, foram acrescentados às amostras 50µL de fenol e 50µL de clorofórmio. Os criotubos foram colocados em uma microcentrífuga por 3 minutos a 10.000 rpm. Este último procedimento foi repetido por mais duas vezes. Em seguida, ao sobrenadante foi adicionado acetato de sódio a 3% e etanol 100% e deixado a -20°C por duas horas. Após essa etapa as amostras foram centrifugadas por mais 10 minutos a 10.00 rpm e o líquido foi descartado. Posteriormente acrescentou-se etanol 70%, centrifugando-se novamente a 10.000 rpm por 3 minutos e eliminou-se o sobrenadante. Em seguida, os criotubos foram colocados em estufa a 37°C por 5 minutos e acrescentado 50µL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0; 1mM EDTA pH 8.0) para conservar o DNA bacteriano e em seguida esse material foi armazenado a -20°C até o momento da execução da PCR.

Amplificação do DNA

Adicionou-se em um criotubo plástico estéril 2µL de DNA genômico (amostra previamente extraída e armazenada a -20°C), 2,5µL dos quatro nucleotídeos que compõem a cadeia de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), 0,2µL da enzima taq polimerase do DNA (Gibco-Life Technology do Brasil®) 2 µL de cada oligonucleotídeo utilizados como “primers” (Gibco-Life Technology do Brasil®), 3µL de magnésia, 12,8µL de água estéril e 2,5µL de solução tampão [10x PCR buffer (500mM KCl; 15 mM MgCl₂; 100mM Tris-HCl pH 9.0)], que forneceram as condições de pH e salinidade para que a síntese se processasse. Foram utilizadas duas seqüências de “primers” (5' GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG 3') e (5' CCG TCA GGG GAC GTT CAG 3') segundo Roças (2004). Os criotubos, já no termociclador (Perkin-Elmer® Gene Amp – PCR System 2400) foram submetidos a 97°C por 1 minuto para desnaturação inicial e 97°C por 45 segundos para desnaturação total da molécula.

Em seguida a temperatura foi abaixada para 55°C por 45 segundos para anelamento. Finalmente, a temperatura foi elevada para 72°C por 1 minuto (extensão) e 72°C por 4 minutos (final), temperaturas ideais para que a polimerase do DNA, utilizada na reação, atuasse dirigindo a síntese de novas cadeias. Os passos de desnaturação, anelamento e síntese foram repetidos por 30 ciclos. Ao término dos ciclos o material foi mantido a -20°C em freezer, até a leitura em gel de agarose (eletroforese).

Eletroforese

A preparação do gel de agarose para eletroforese consistiu em dissolver a agarose na concentração desejada e aquecê-la até a sua completa solução. Antes da solidificação do gel, foi introduzido um pedaço de plástico denteado (pente) para formar orifícios. Quando o gel solidificou, foi mergulhado em uma cuba para eletroforese com solução tampão (TAE 1X) de pH neutro, e nos orifícios foram depositadas as amostras de DNA.

A corrente elétrica foi transmitida ao longo da cuba pelos íons do tampão, produzindo um campo elétrico que provocou a migração do DNA através do gel de agarose. A migração das amostras foi efetuada durante 40 minutos com gel a 1,5% em $V/mA = 100/400$.

Ao gel foi acrescentada uma solução de brometo de etídio para que as moléculas se intercalassem entre os nucleotídeos na dupla hélice do DNA e com isso fosse possível a observação sob a luz ultravioleta dos fragmentos presentes no gel por meios da formação de bandas.

Nesse gel foi colocado amostras de DNA ladder (evidenciando fragmentos de tamanho conhecidos) que serviram como pontos de referências. O teste foi realizado também com uma cepa padrão de referência *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Como resultado, foi obtida uma migração diferencial dos fragmentos. Portanto em um dado período os fragmentos pequenos de DNA alcançaram distancias maiores em relação a origem, do que os fragmentos grandes que apresentaram dificuldades de atravessar a resistência da matriz.

Leitura da eletroforese

Para a observação das bandas demarcadas, após a etapa de eletroforese, o gel foi analisado em um transiluminador ultravioleta (Phar-

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

macia LKB Macro®) e posteriormente fotografado com máquina Polaróide®. A revelação das fotografias foi realizada em câmara escura por aproximadamente 1 minuto e 30 segundos.

Para a interpretação estatística dos resultados obtidos, foi utilizado o método de Fisher.

RESULTADOS

Os testes bioquímicos clássicos identificaram todas as estirpes isoladas como sendo da espécie *E. faecalis*, enquanto a técnica de PCR revelou que 10 estirpes não pertenciam a espécie pesquisada (tabela 1). Houve diferença estatística entre os métodos na identificação do *Enterococcus faecalis* ($p < 0,05$).

Tabela 1. Comparação entre os métodos bioquímicos e PCR para identificação das estirpes bacterianas.

| Estirpe estudada | Identificação pelos testes bioquímicos | | Identificação pela PCR [#] | |
|------------------|--|----------|-------------------------------------|----------|
| | Positivo | Negativo | Positivo | Negativo |
| E. faecalis | 60 | - | 50 | 10 |

[#] 5' GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG 3'
5' CCG TCA GGG GAC GTT CAG 3'

DISCUSSÃO

Enterococcus são cocos Gram-positivos do trato gastrointestinal de animais inclusive o homem e causam uma grande diversidade de infecções como as de urina, sangue, endocárdio, abdômen, trato biliar e ainda agravam feridas cirúrgicas (FURUMURA *et al.*, 2006). Para causarem infecções eles utilizam fatores de virulência específicos que lhes permitem invadir e colonizar o hospedeiro (KAYAO-GLU; ØRSTAVICK, 2004).

A identificação de espécies de *Enterococcus* sempre representou uma problemática muito grande para o laboratório de Microbiologia, pelo fato de que o número de espécies é muito grande, com poucas variações fenotípicas, dificultando assim, a interpretação dos testes bioquímicos laboratoriais (WINN JÚNIOR *et al.*, 2008). Vários métodos e esquemas bioquímicos de identificação de espécies de *Enterococcus* têm sido propostos na literatura (MANERO; BLANCH, 1999, FACKLAM; COLLINS, 1989).

A identificação precisa de microrganismos isolados é primordial em Microbiologia clínica. Para uma espécie microbiana ser identifi-

cada por meio de suas características fenotípicas, é necessário, inicialmente, o cultivo do microrganismo. Talvez, uma grande dificuldade associada com a identificação de espécies bacterianas baseada em características fenotípicas, está no fato de ocorrer divergência ou convergência. Divergência ocorre para linhagens de algumas espécies, geneticamente similares, mas com características fenotípicas diferentes. Convergência ocorre para linhagens de diferentes espécies, geneticamente diferentes, mas que se comportam fenotipicamente de forma similar. Em ambas situações, os diagnósticos por testes fenotípicos resultam em identificação errônea (SIQUEIRA JUNIOR; ROÇAS, 2005).

A Reação em Cadeia da Polimerase tem-se apresentado como um valioso instrumento na detecção e identificação de bactérias e vírus (SLOTS *et al.*, 1995; ASHIMOTO *et al.*, 1996) e também na elucidação do papel de bactérias específicas no processo de doenças bucais devido à sua habilidade de detectar acuradamente espécies em populações mistas (VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, 2002).

Método relativamente novo, descrito por Kary Mullis no final dos anos 80 (KONEMAM *et al.*, 2001), tem revolucionado a genética molecular, pois possibilita uma nova estratégia na análise de genes por meio de um procedimento simples e rápido para avaliação baseada em ácidos nucleicos, capaz de detectar a presença de até um microrganismo na amostra (SAIKI *et al.*, 1985; FARAH, 1997; ALBERTS *et al.*, 1997).

Um resultado produzido pela Reação em Cadeia da Polimerase pode ser alcançado em algumas horas ou no máximo em um dia. É a técnica de preferência para diagnóstico, tendo como principal vantagem o fato de requerer quantidades muito pequenas de DNA e de ser eficaz até quando realizada a partir de uma molécula de DNA proveniente de uma única célula. (MULLIS; FALOOMA, 1987; EISENTEIN, 1990; WATANABE; FROMMEL, 1996)

Esta pesquisa revelou a eficiência dos testes bioquímicos clássicos em relação ao teste da Reação em Cadeia da Polimerase, com significância estatística ($p < 0,05$). Alguns aspectos em relação aos resultados obtidos devem ser aqui discutidos.

Embora os testes bioquímicos tenham revelado elevada eficiência na identificação das estirpes, a possibilidade de convergência nos testes, não pode ser descartada, conforme a literatura demonstra (SIQUEIRA JUNIOR; ROÇAS, 2005). Assim, se confirmariam os testes de PCR que demonstraram 10 estirpes não pertencentes à espécie pesquisada, confirmando diferenças genotípicas nestas linhagens.

Vale lembrar que a técnica de PCR apresenta elevada especificidade para o diagnóstico e identificação de bactérias obtidas a partir

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. *SALUSVITA*, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.

de amostras clínicas ou a partir de culturas puras (SAIKI *et al.*, 1985; FARAH, 1997; ALBERTS *et al.*, 1997). Dessa forma, o teste de PCR teria revelado que 50 linhagens pertenciam à espécie pesquisada.

CONCLUSÕES

Concluimos que a coleção de linhagens de *Enterococcus* isoladas e utilizadas nesta pesquisa, foram identificadas como *E. faecalis* através de um esquema bioquímico tradicional, baseando-se em suas características fenotípicas. Pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase, 10 estirpes da coleção não foram identificadas como *E. faecalis*, revelando diferenças em suas características genotípicas.

REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* Tecnologia do DNA recombinante. In: _____. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. cap.7, p. 291-334.
- ASHIMOTO, A. *et al.* Polymerase chain reaction detection of 8 putative periodontal pathogens in subgingival plaque of gingivitis and advanced periodontitis lesions. **Oral Microbiol Immunol**, Copenhagen, v. 11, n. 4, p. 266-273, 1996.
- EISENSTEIN, B. I. New molecular techniques for microbial epidemiology and the diagnosis of infectious diseases. **J Infect Dis**, Oxford, v. 161, n. 4, p. 595-602, Apr.1990.
- FABRICIUS, L. *et al.* Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scand J Dent Res**, Copenhagen, v. 90, n. 2, p. 134-144, Feb. 1982
- FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 27, n. 4, p. 731-734, 1989.
- FARAH, S. B. DNA no diagnósticos das doenças humana. In: _____. **DNA: segredos & mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997. cap. 5, p.103-140.
- FURUMURA, M. T. *et al.* Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. **Braz. J. Microbiol.** [online], São Paulo, v. 37, n. 3, p. 230-236, 2006.

KAYAOGU, G.; ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Crit Rev Oral Biol Med**, Boca Raton, v. 15, n. 5, p. 308-20, 2004.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001. 1465 p.

MANERO, A.; BLANCH, A. R. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. **Appl Environ Microbiol**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4425-4430, 1999.

MULLIS, K. H.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. **Methods Enzymol**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURRAY, P. R. *et al.* **Medical microbiology**. 3rd ed. St. Louis: Mosby-Year Book, 1998. 719 p.

ROÇAS, I. N.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J Endod**, New York, v. 30, p. 315-320, 2004.

SAIKI, R. K. *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, Dec.1985.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; ROÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 1 – current molecular technologies for microbiological diagnosis. **J Endod**, New York, v. 31, n. 6, p. 411-423, 2005.

SLOTS, J. *et al.* Detection of putative periodontal pathogens in subgingival specimens by 16S ribosomal DNA amplification with the polymerase chain reaction. **Clin Infect Dis**, Oxford, v. 20, supl. 2, p. 304-307, 1995.

VELÁSQUEZ-MELÉNDEZ, G. Prevalence of putative periodontopathogens from periodontal patients and healthy subjects in São Paulo, SP, Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 1, p. 1-5, Jan./Feb. 2002.

WATANABE, K.; FROMMEL, T. O. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in oral samples by use of the Polymerase Chain Reaction. **J Dent Res**, Thousand Oaks, v. 72, n. 6, p. 1040-1044, June 1996.

WEIGER, R. *et al.* Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Endod Dent Traumatol**, Copenhagen, v.11, p.15-19, 1995.

WINN JÚNIOR, W. C. *et al.* **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1565 p.

FRANCO, Adriana Terezinha de Mattias *et al.* Comparação entre teste bioquímico clássico e o método da reação em cadeia da Polimerase (PCR) para identificação de estirpes de *Enterococcus faecalis* isoladas da cavidade oral. **SALUSVITA**, Bauru, v. 31, n. 3, p. 191-202, 2012.