

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SEÇÃO CIRCULANTE

**ERICKA TAVARES PINHEIRO**

**INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO  
INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de grau de Mestre em Clínica Odontológica, Área de Endodontia

**PIRACICABA  
2000**

ERICKA TAVARES PINHEIRO

# INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas,  
para obtenção de grau de Mestre em Clínica  
Odontológica, Área de Endodontia

Orientadora:

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

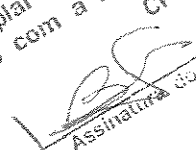
Banca Examinadora:

Prof Dr. Caio Cezar Randi Ferraz

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Prof. Dr. José Freitas Siqueira Júnior

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CPG-036/83  
CPG. 27 / 03 / 2001

  
Assinatura do Orientador

PIRACICABA  
2000

UNIDADE	UNICAMP
N.º CHAMADA:	P655i
V.	Ex.
TOMBO BC/	44856
PROC.	16-392101
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC.º	R\$44,00
DATA	10/05/01
N.º CPD	

CM-00155181-5

### Ficha Catalográfica

P655i Pinheiro, Ericka Tavares.  
 Investigação de bactérias associadas ao insucesso do tratamento endodôntico. / Ericka Tavares Pinheiro. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.  
 xx, 185p. : il.

Orientadora : Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.  
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. 2. Bactéria. 3. Testes de sensibilidade bacteriana.  
 I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba.  
 III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 15 de Dezembro de 2000, considerou a candidata ERICKA TAVARES PINHEIRO aprovada.

1. Profa. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

2. Prof. Dr. JOSÉ FREITAS SIQUEIRA JUNIOR

3. Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÃO CIRCULANTE

*Dedico este trabalho ao meu esposo **Fábio**, por todo amor, apoio e compreensão, fundamentais para a realização deste sonho.*

*Aos meus pais, **José Wyló e Valda**, pelo exemplo de vida e de sabedoria, pelo amor e atenção constantes em todos os momentos da minha vida.*

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço a DEUS, pelo amor de Pai, pelo dom da vida, pelos momentos alegres e pela força nos momentos difíceis.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Brenda Gomes, pelo incentivo, pela dedicação e disponibilidade em transmitir seus conhecimentos, fundamentais para minha formação científica; pela atenção, paciência, confiança, e amizade, meu sincero agradecimento.*

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÃO CIRCULANTE

*Ao Prof. Dr. Francisco de Souza Filho, pela oportunidade de compartilhar seus conhecimentos clínicos e científicos, pela atenção, estímulo, dedicação e exemplo.*



*Ao Prof. Dr. Luiz Valdrighi, pelo seu grande conhecimento e experiência, pela simplicidade e pelo carinho. Meu respeito e admiração.*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Antônio Wilson Sallum**, pelo apoio necessário para a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury**, coordenadora do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP, pelo apoio recebido.

À **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, pela dedicação, apoio e orientações.

Ao **Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho**, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelo exemplo profissional, pelo estímulo e atenção dispensada sempre que solicitado.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz e Prof. Dr. Fabrício Batista Teixeira**, professores da disciplina de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade recebida.

Ao Professores **Sérgio Araújo Holanda Pinto, Roberto Borges e Mônica do Vale**, da disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, pela formação, incentivo e amizade recebidos.

Aos Professores das áreas de Farmacologia e Microbiologia da FOP/UNICAMP, pela atenção dispensada sempre que solicitada.

Aos amigos de Mestrado em Endodontia, **Cícero Gadê-Neto, Ronaldo Rodrigues, Noboru Imura, Ezilmara Rolim de Sousa, Soraia Carvalho e Tétis Sauáia**, pelo companheirismo, colaboração e amizade.

Aos amigos de pós-graduação **Eneida Santos de Araújo e João Eduardo Gomes Filho**, por toda amizade, força e carinho, muito importantes nos momentos vividos.

Aos demais colegas do curso de pós-graduação e da graduação da FOP/UNICAMP, pela amizade.

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia **Denize L. de Pinho, Maria Aparecida Buscariol, Rubens M. Payão, Adailton dos Santos Lima e Maria Aparecida Riva**, pela convivência e pelo auxílio recebido para a realização deste trabalho.

Às estagiárias do laboratório de Microbiologia da área de Endodontia, **Kéli Cristina de Carvalho, Patrícia Maria Maccagnan e Morgana Eli Viana**, pela amizade e cooperação.

Aos pacientes, meu agradecimento especial, sem os quais a realização desse trabalho não seria possível.

À **FAPESP** pelo apoio financeiro, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	1
LISTA DE TABELAS	3
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	5
RESUMO	7
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
3. PROPOSIÇÃO	69
4. MATERIAIS E MÉTODOS	71
5. RESULTADOS	91
6. DISCUSSÃO	101
7. CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
ANEXOS	133

## LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1A. Coleta do canal radicular	77
Figura 4.1B. Meio de transporte VMGA III	77
Figura 4.1C. Diluição	77
Figura 4.1D. Agitador de tubos	77
Figura 4.1E. Inoculação	77
Figura 4.1F. Incubação na câmara de anaerobiose	77
Figura 4.2A. Primeira cultura	79
Figura 4.2B. Cultura pura	79
Figura 4.2C. Requerimento gasoso	79
Figura 4.2D. Morfologia microscópica	79
Figura 4.2E. Teste da catalase	79
Figura 4.2F. Kit de identificação api20 Strep	79
Figura 4.2G. Identificação da espécie bacteriana	79
Figura 4.3. E-test	85
Figura 4.4A. Cultura pura	87
Figura 4.4B. Preparo do inóculo bacteriano	87
Figura 4.4C. Agitação do inóculo bacteriano	87
Figura 4.4D. Verificação da turbidez do meio no espectrofotômetro	87
Figura 4.4E. Inoculação	87
Figura 4.F. E-test	87
Figura 4.4G. Fita do E-test na placa inoculada	87

Figura 4.4H. Incubação	87
Figura 4.4I. Halo de inibição em forma de elipse	87
Figura 4.5A. Halo de inibição em forma de elipse	89
Figura 4.5A. Verificação da CIM	89
Figura 5.1. Distribuição de espécies microbianas em 30 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico	94
Figura 5.2. Frequência de bactérias anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas, Gram-positivas e Gram-negativas.	96
Figura 5.3. Prevalência dos gêneros bacterianos isolados em 30 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico	97
Figura II. Meios de cultura	145
Figura IV.1. Câmara de anaerobiose	151
Figura V.1. Kit Api 20 Strep	157
Figura V.2. Kit Api Staph	163
Figura V.3. Kit Rapid ID 32 A	169
Figura V.4. Kit RapID ANA II	175
Figura V.5. Kit RapId NH	181

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Valores interpretativos das concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobianos avaliados nos testes de <i>Enterococcus</i> spp.	83
Tabela 4.2. Valores interpretativos das concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobianos avaliados nos testes de bactérias anaeróbias	84
Tabela 5.1. Características clínicas de 30 dentes com insucesso endodôntico	90
Tabela 5.2. Características radiográficas de 30 dentes com insucesso endodôntico	90
Tabela 5.3. Microrganismos isolados de 30 canais de dentes com insucesso endodôntico	92
Tabela 5.4. Valores interpretativos das concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antibióticos testados contra <i>Enterococcus faecalis</i>	95
Tabela 5.5. Suscetibilidade antimicrobiana de <i>Enterococcus faecalis</i> baseadas nos valores interpretativos da NCCLS	96
Tabela 5.6. Valores interpretativos das concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antibióticos testados contra espécies do gênero <i>Peptostreptococcus</i>	96
Tabela 5.7. Suscetibilidade antimicrobiana de espécies do gênero <i>Peptostreptococcus</i> baseadas nos valores interpretativos da NCCLS	96

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - porcentagem

& - e

µg/mL – microgramas por mililitros

+ - mais

AC - amoxicilina

Ác. – ácido

ADA – American Dental Association

AZ - azitromicina

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CM - clindamicina

CO<sub>2</sub>- gás carbônico

EM - eritromicina

et al. – e outros

FAA – Fastidious Anaerobe Agar

FAB – Fastidious Anaerobe Broth

Fig. – Figura

g - gramas

h – horas

H<sub>2</sub> - hidrogênio

I - intermediário

KAN – Kanamicina



mg – miligramas

mL – mililitros

mm – milímetros

n – número de amostras

nm - nanômetros

N<sub>2</sub>- nitrogênio

NAL – Ácido nalidíxico

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NEO – Neomicina

N<sup>o</sup> - número

O<sub>2</sub> – oxigênio

°C – graus Celsius

p – nível de significância

PG – benzilpenicilina

R – resistente

S - sensível

spp. – species

Tab. – Tabela

UK – United Kingdom

USA – United States of America

VAN – Vancomicina

VMGA - Viability Medium Göteborg Agar

XL – amoxicilina associada ao ácido clavulânico

## RESUMO

Vários fatores estão envolvidos no insucesso do tratamento endodôntico, entretanto as bactérias são os principais agentes etiológicos. Tais microrganismos podem ter sobrevivido ao tratamento endodôntico anterior ou reinfestado o canal através das microinfiltrações. Estudos revelam que a microbiota do canal radicular do dente tratado endodonticamente associado à lesão periapical persistente difere substancialmente da microbiota de dentes com polpas necrosadas e não tratados. A microbiota dos canais com insucesso endodôntico é composta por um número bastante limitado de espécies bacterianas, que se apresentam mais resistentes aos métodos de combate à infecção utilizados na Endodontia. O objetivo deste trabalho foi estudar a microbiota de 30 dentes com insucesso do tratamento endodôntico e realizar testes de sensibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas. Foram utilizados meios de transporte, cultura e incubação que propiciam o crescimento de bactérias anaeróbias estritas. Microrganismos viáveis estavam presentes em 80% dos casos, sendo que a maioria dos canais apresentava somente 1 ou 2 espécies bacterianas. Do total de 55 espécies bacterianas isoladas, 58% eram bactérias anaeróbias facultativas, 42% anaeróbias estritas, 80% Gram-positivas e 20% Gram-negativas. Os gêneros bacterianos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares foram: *Enterococcus* (36,7%), *Streptococcus* (33,3%), *Peptostreptococcus* (23,3%), *Actinomyces* (13,3%), *Prevotella* (10%), *Staphylococcus* (10%), *Gemella* (10%), *Fusobacterium* (6,7%), *Veillonella* (6,7%), *Lactobacillus* (6,7%), *Propionibacterium* (3,3%) e *Haemophilus* (3,3%). Espécies dos gêneros *Enterococcus* e *Peptostreptococcus* foram testadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana através do método do E-test, utilizando as seguintes substâncias: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina e clindamicina. *Enterococcus faecalis* e *Peptostreptococcus* spp. foram sensíveis a benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. Entretanto, 20% dos *Enterococcus faecalis* foram resistentes a eritromicina e 60% a azitromicina. Concluímos que a microbiota dos canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico é composta em sua maioria por bactérias anaeróbias facultativas, predominantemente Gram-positivas. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana revelaram a presença de resistência bacteriana entre espécies de *Enterococcus faecalis* spp. aos antibióticos eritromicina e azitromicina.

**Palavras-Chave:** endodontia, bactéria, suscetibilidade antimicrobiana

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF BACTERIA ASSOCIATED WITH ENDODONTIC FAILURE

Although many failure cases of endodontic therapy are caused by technical problems during treatment, the cause is generally believed to be intracanal infection resisting treatment or microorganisms invading the canal via coronal leakage of the root filling. Studies of the microbiota from the canals of teeth with failure of endodontic therapy have revealed that the flora differ markedly from that of untreated necrotic dental pulps. It appears to be a very limited assortment of microorganisms, and studies have indicated difficulties in the elimination of this microbiota during endodontic retreatments. This study aimed to evaluate the microbiota of 30 teeth with failed endodontic treatment and to test the sensitivity of this microbiota to antibiotics. Microbial samples, isolation and speciation were done using advanced microbiologic techniques for anaerobic species. Microorganisms were recovered from 80% of the examined teeth. In most of the cases, one or two strains per canal were found. From the 55 microbial species isolated, 58 % were facultative anaerobe species, 42 % strict anaerobes, 80% Gram-positive organisms and 20 % Gram-negatives. The most frequently bacterial genera recovered from the root canals were *Enterococcus* (36,7%), *Streptococcus* (33,3%), *Peptostreptococcus* (23,3%), *Actinomyces* (13,3%), *Prevotella* (10%), *Staphylococcus* (10%), *Gemella* (10%), *Fusobacterium* (6,7%), *Veillonella* (6,7%), *Lactobacillus* (6,7%), *Propionibacterium* (3,3%) and *Haemophilus* (3,3%). Antibiotic sensitivity of *Enterococcus* and *Peptostreptococcus* species was accomplished with the E-test System. These bacterial isolates were tested for their susceptibility/resistance to benzylpenicilin, amoxicilin, amoxicilin combined with clavulanate, erythromycin, azithromycin, and clindamycin. *Enterococcus* spp. and *Peptostreptococcus* spp. were susceptible to benzylpenicilin, amoxicilin, amoxicilin combined with clavulanate. However, 20% of the *Enterococcus* spp. isolates were resistant to erythromycin and 60% of these isolates were resistant to azithromycin. It was concluded that microbial flora in canals after failure of the endodontic therapy comprised predominantly facultative anaerobic species and Gram-positive organisms. Antibiotic susceptibility results showed erythromycin and azithromycin resistance among *Enterococcus* spp.

**Key-words:** endodontics, bacteria, antibiotic susceptibility

## 1. INTRODUÇÃO

Bactérias desempenham um papel fundamental na etiopatogenia das alterações pulpares e periapicais (KAKEHASHI *et al.*, 1965; MÖLLER *et al.*, 1981; TAKAHASHI, 1998). O tratamento endodôntico tem como principal objetivo a máxima eliminação de bactérias do sistema de canais radiculares. A eliminação da infecção do canal radicular propicia um ambiente favorável ao reparo das lesões periapicais, enquanto a persistência de microrganismos exerce um papel significativo nas falhas do tratamento endodôntico (SJÖGREN *et al.*, 1997).

Embora muitos fatores de ordem técnica possam estar envolvidos, as bactérias resistentes ao tratamento endodôntico que se proliferam no canal radicular, ou aquelas que contaminam o canal após o tratamento endodôntico através das infiltrações coronárias, são os principais responsáveis pelo fracasso do tratamento endodôntico (LIN *et al.*, 1991, 1992; DAHLÉN & MÖLLER, 1992; CHEUNG, 1996; SIQUEIRA JR & LOPES, 1999).

O insucesso do tratamento endodôntico é determinado clinicamente baseado em acompanhamento radiográfico; surgimento, persistência ou aumento de uma lesão periapical; e em sinais e sintomas do dente tratado endodonticamente (STRINDBERG *et al.*, 1956). Um acompanhamento por um período de no mínimo 4 anos seria considerado desejável (STRINDBERG *et al.*, 1956; ENGSTRÖM *et al.*, 1964; SJÖGREN *et al.*, 1997). Para resolução dos casos de insucesso existem duas modalidades de tratamento: o retratamento endodôntico e a cirurgia apical. O retratamento endodôntico é, de acordo com a maioria dos autores, o tratamento de primeira escolha, porém a cirurgia periapical consiste em um tratamento adicional nos casos em que o retratamento fracassou ou não foi possível de ser realizado (FRIEDMAN & STABHOLTZ, 1986; HEPWORTH & FRIEDMAN, 1997; BRIGGS & SCOTT, 1997).

ALLEN *et al.* (1989) e HEPWORTH & FRIEDMAN (1997), analisando o sucesso do retratamento endodôntico, encontraram uma taxa de aproximadamente 66%. Esse índice se apresenta modesto quando comparado com a alta taxa de sucesso do tratamento

endodôntico - 85% a 96% (SWARTZ *et al.*, 1983; SJÖGREN *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1993). O menor índice de sucesso do retratamento endodôntico pode indicar, além de dificuldades técnicas devido a fatores iatrogênicos do tratamento anterior, uma dificuldade na eliminação da microbiota do canal radicular de dentes com insucessos do tratamento endodôntico (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998).

Enquanto a microbiota da polpa necrótica tem sido minuciosamente estudada através de técnicas microbiológicas avançadas (SUNDQVIST *et al.*, 1989; BAUMGARTNER, 1991; BAUMGARTNER & FALKER, 1991; SUNDQVIST, 1992a,b; SATO *et al.*, 1993; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996a,b,c; BAUMGARTNER *et al.*, 1999), os dados sobre a microbiologia do canal radicular dos dentes com insucesso endodôntico são raros (SUNDQVIST *et al.* 1998, MOLANDER *et al.* 1998).

ENGSTRÖM (1964) e MÖLLER (1966) estudaram microbiologicamente os canais de dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais e relataram um crescimento bacteriano de 38% e 45,5% respectivamente, com predomínio de bactérias facultativas. Porém, até a década de 70, as técnicas de isolamento e cultivo de bactérias anaeróbias eram deficientes.

Estudos recentes realizados por MOLANDER *et al.* (1998) e SUNDQVIST *et al.* (1998) mostraram que a microbiota de canais com insucesso do tratamento endodôntico difere daquela encontrada normalmente em dentes necrosados e não tratados, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, sendo caracterizada por monoinfecções com predominância de bactérias anaeróbias facultativas.

A particularidade da microbiota encontrada nos canais com tratamento endodôntico prévio que fracassaram deve-se a um processo de seleção dependente da resistência específica de determinados microrganismos aos procedimentos antimicrobianos e medicamentos utilizados durante a terapêutica endodôntica; e da capacidade de sobrevivência em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são

mínimas (SUNDQVIST *et al.*, 1998). Novas estratégias de combate à infecção devem ser baseadas no real conhecimento da microbiota desses dentes (MOLANDER *et al.*, 1998).

Estudos têm demonstrado que os microrganismos isolados de dentes tratados endodonticamente são de difícil remoção. *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* têm sido encontrados em canais com lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico (NAIR *et al.*, 1990a; SUNDQVIST *et al.*, 1998; MOLANDER *et al.*, 1998). Os gêneros *Propionibacterium* e *Actinomyces* podem se estabelecer e sobreviver nos tecidos periapicais, sendo responsáveis pelo insucesso do tratamento endodôntico (SUNDQVIST & RETERVING, 1980; NAIR & SCHOEDER, 1984; SJÖGREN *et al.*, 1988).

DEBELIAN *et al.* (1995), estudando a bacteremia associada à terapia endodôntica, isolaram *Propionibacterium* e *Actinomyces* do canal radicular e do sangue dos pacientes durante e após o tratamento endodôntico. Os referidos autores, em trabalho anterior, enfatizaram que microrganismos que entram na circulação sanguínea são geralmente eliminados pelo hospedeiro dentro de minutos; entretanto, em pacientes com disfunções de válvulas cardíacas ou doenças vasculares, a bacteremia pode ser um perigo potencial, levando comumente à endocardite bacteriana (DEBELIAN *et al.*, 1994).

Embora antibióticos não sejam comumente utilizados como adjuntos ao tratamento endodôntico de dentes associados a alterações crônicas, como no caso de lesões perirradiculares persistentes após o tratamento endodôntico, em pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana eles se tornam importantes para proteção do paciente durante o retratamento, assim como em casos de reagudização e sintomatologia e/ou exsudato persistente (ABBOTT *et al.*, 1990; GRAD, 1997).

O tratamento desses casos pode ser auxiliado pela determinação da sensibilidade antimicrobiana das bactérias patogênicas. Porém, como esses resultados demoram mais de 48 horas - para isolamento de bactérias e testes de sensibilidade antimicrobiana - devemos

obter, para aplicação da terapêutica clínica, um conhecimento das bactérias envolvidas nesses casos de insucesso e um padrão de sensibilidade dessas bactérias aos antibióticos (ABBOTT *et al.*, 1990). Entretanto esses padrões mudam com a possibilidade de surgimento de bactérias resistentes, o que torna importante o monitoramento desse padrão através de testes de sensibilidade antimicrobiana, permitindo o desenvolvimento de métodos de ação para um tratamento mais eficaz (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; FORBES *et al.*, 1998).

Este trabalho teve o objetivo de estudar a microbiota dos canais de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais e realizar testes de suscetibilidade antimicrobiana dessas bactérias para avaliar sua sensibilidade ou resistência aos antibióticos comumente usados na Endodontia. Um maior estudo das bactérias associadas ao fracasso do tratamento endodôntico poderia nos levar a uma melhoria das técnicas de combate à infecção e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso do retratamento.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### SUCESSO E INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO

O insucesso do tratamento endodôntico é determinado com bases nos achados radiográficos e sinais e/ou sintomas clínicos do dente tratado endodonticamente (STRINDBERG, 1956). Segundo o autor, eram considerados fracassos os dentes com rarefações ósseas que aumentavam, permaneciam inalteradas, somente diminuíaam de tamanho ou surgiam após o tratamento endodôntico.

Crítérios clínicos e radiográficos de avaliação do sucesso ou fracasso endodôntico, foram apresentados pela Associação Americana de Endodontia em 1987 (QUALITY ASSURANCE GUIDELINES). Segundo esta Associação, para avaliação clínica, os seguintes critérios subjetivos e objetivos devem ser usados: dor a palpação, mobilidade dentária, doença periodontal, fistula, sensibilidade à percussão, função do dente, sinais de infecção ou edema, e sintomas subjetivos. Assim, são considerados fracassos endodônticos, dentes que apresentam sintomas subjetivos persistentes, fistula recorrente ou edema, desconforto à palpação ou à percussão, evidência de uma fratura irreparável da unidade dentária, excessiva mobilidade ou perda periodontal progressiva, e inabilidade do dente exercer sua função. Os critérios radiográficos demonstram insucesso quando há: um aumento da espessura do ligamento periodontal; ausência do reparo ósseo no interior da lesão ou aumento do tamanho da rarefação; ausência da formação de uma nova lâmina dura; presença de rarefações ósseas em áreas onde previamente não existiam; espaços não-obturados visíveis no canal, apicalmente ou lateralmente; e reabsorções ativas associadas a outros sinais radiográficos de insucesso.

O tempo de proervação pós-tratamento endodôntico para determinar sucesso/insucesso varia entre os autores. Estudos têm indicado um período mínimo de 4 anos pós-tratamento endodôntico (STRINDBERG *et al.*, 1956; ENGSTRÖM *et al.*, 1964; QUALITY ASSURANCE GUIDELINES, 1987; SJÖGREN *et al.*, 1997); enquanto outros



recomendam 2 anos (BENDER *et al.*, 1966; BERGENHOLTZ *et al.*, 1979), 1 ano e meio (FRIEDMAN *et al.*, 1995) e 1 ano (REIT, 1987).

Estudos têm demonstrado que o tratamento endodôntico apresenta uma alta taxa de sucesso. SJÖGREN *et al.* (1990), em uma avaliação clínico-radiográfica de 356 dentes após 8 a 10 anos do tratamento endodôntico, encontraram 96% de sucesso em dentes sem lesão periapical e 86% naqueles com necrose pulpar e lesão. SWARTZ *et al.* (1983) analisaram o sucesso endodôntico de 1.007 dentes após 20 anos do tratamento endodôntico, e encontraram uma taxa de sucesso de 87,79%. SMITH *et al.* (1993), realizando um estudo retrospectivo por um período de 5 anos de 821 casos, detectaram uma taxa de sucesso de 84,29%. FRIEDMAN *et al.* (1995), verificaram um índice de sucesso de 97% em casos de dentes sem lesões periapicais, enquanto em dentes com lesões, o reparo estava presente em apenas 63,2% dos casos.

Esses autores demonstraram que determinados fatores, como a presença da lesão periapical, influem no prognóstico do tratamento endodôntico. Em relação ao fracasso do tratamento endodôntico, vários fatores e causas têm sido mencionados (LIN *et al.*, 1992; CHEUNG, 1996, NAIR *et al.*, 1999).

## **ETIOLOGIA DO INSUCESSO ENDODÔNTICO**

O fracasso do tratamento endodôntico está associado ao surgimento ou à persistência de uma inflamação periapical (STRINDBERG *et al.*, 1956). Bactérias presentes no interior dos canais radiculares constituem os principais agentes etiológicos da inflamação periapical (KAKEHASHI *et al.*, 1965; MÖLLER *et al.*, 1981; TAKAHASHI, 1998). O objetivo do tratamento endodôntico é a eliminação da infecção, através do preparo químico-mecânico e obturação dos canais radiculares, propiciando um ambiente favorável à manutenção da saúde periapical ou ao reparo de lesões periapicais pré-existent. Na maioria dos casos em que o tratamento endodôntico fracassa, o insucesso ocorre devido a procedimentos insatisfatórios de controle e eliminação da infecção (NAIR *et al.*, 1999).

Problemas comuns que podem levar ao fracasso da terapia endodôntica incluem a falta de controle asséptico durante o tratamento, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, falhas na instrumentação, obturações inadequadas, e restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o tratamento endodôntico (CHEUNG, 1996).

SMITH *et al.* (1993) ressaltaram a influência dos fatores técnicos, como o nível da obturação, na taxa de sucesso do tratamento endodôntico. Os autores encontraram que os canais com sobre-obturações e obturações incompletas apresentavam um maior índice de insucesso quando comparado com aqueles obturados a 2mm do ápice radiográfico. Entretanto esses fatores só foram determinantes de insucesso em canais com polpas necrosadas e lesões periapicais.

SJÖGREN *et al.* (1990) relataram que o nível da instrumentação e obturação dos canais radiculares apresentou uma influência significativa no prognóstico do tratamento endodôntico de dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais, que apresentaram uma taxa de sucesso inferior aos dentes com polpas vitais. Os autores ressaltaram que fatores não identificados ou analisados no estudo, como a persistência de bactérias viáveis no sistema de canais radiculares, podem ser críticos no prognóstico de dentes tratados endodonticamente.

Segundo DAHLÉN & MÖLLER (1992), as falhas técnicas do tratamento endodôntico não podem, por si só, causar ou manter a inflamação periapical. Entretanto, obturação incompleta do canal radicular deixa um espaço na região apical, favorecendo a persistência de microrganismos e seus produtos, que causam danos aos tecidos periapicais. Além desse fator, uma obturação incompleta resulta muitas vezes de uma instrumentação inadequada, o que proporciona a manutenção de restos necróticos e bactérias no canal radicular.

GUTIÉRREZ *et al.* (1999), através da análise, em microscopia eletrônica de varredura, de dentes com lesões periapicais e limas endodônticas ultrapassando o ápice ou

canais sobre-obturados, demonstraram a presença de bactérias nas espirais das limas que ultrapassavam o forame apical, e principalmente na superfície radicular ao redor do forame principal, firmemente aderidas em lacunas de reabsorção radicular. No grupo controle, que consistia de dentes com polpas vitais, sobre-instrumentados e sobre-obturados, nenhuma bactéria foi detectada na superfície das limas, no ápice, ou no cone de guta-percha extruído além do ápice.

Casos de acidentes, como desvios, degraus, perfurações, instrumentos fraturados e sobre-obturações, usualmente resultam em fracasso quando associados a um processo infeccioso (SIQUEIRA JR. & LOPES, 1999).

#### *Fatores microbianos*

Estudos demonstram que as bactérias e seus produtos são os principais responsáveis pelo insucesso do tratamento endodôntico (MALOOLEY *et al.*, 1979; PITT FORD, 1982; LIN *et al.*, 1991, 1992).

LIN *et al.* (1991) estudaram, clinicamente, radiograficamente e histobacteriologicamente, 150 casos com insucesso do tratamento endodôntico, e detectaram bactérias em 69% dos dentes, presentes principalmente no interior dos canais radiculares, estando relacionadas com a severidade da inflamação periapical.

LIN *et al.* (1992), analisando os fatores associados ao fracasso do tratamento endodôntico de 236 dentes através da análise clínica, radiográfica e histobacteriológica, detectaram a presença de bactérias nos canais radiculares em 67% dos casos. Os autores relataram que a persistência da infecção bacteriana no sistema de canais radiculares, e a presença pré-operatória de uma lesão periapical, constituíam os principais fatores associados ao insucesso endodôntico. A extensão apical da obturação do canal radicular, isto é, sobre-obturado ou sub-obturado, parecia não haver correlação com os fracassos do tratamento endodôntico.

Os microrganismos presentes nos canais de dentes tratados endodonticamente que fracassaram podem ser derivados de microrganismos presentes originalmente no canal radicular infectado (FUKUSHIMA *et al.*, 1990; SJÖGREN *et al.*, 1997), ou introduzidos no canal por procedimentos inadequados durante o tratamento endodôntico (SIREN *et al.*, 1997), ou ainda, microrganismos que penetraram no canal através de um selamento coronário defeituoso (CHEUNG, 1996).

FUKUSHIMA *et al.* (1990) estudaram as bactérias presentes em dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais, as quais eram consideradas lesões fechadas, por não apresentarem o canal radicular exposto ao meio bucal. Foram utilizados 21 dentes extraídos, cujos ápices radiculares foram examinados através da microscopia eletrônica de varredura e através de coletas microbiológicas. Bactérias foram isoladas em 60% das coletas, e, através da microscopia eletrônica de varredura, estavam localizadas entre o término do material obturador e o forame apical. Os autores sugeriram que, devido à ausência de contato com a microbiota oral, as bactérias isoladas eram derivadas de microrganismos que colonizaram o canal antes ou durante o tratamento endodôntico.

SJÖGREN *et al.* (1997) estudaram a relação entre a presença de bactérias no canal radicular no momento da obturação e o sucesso do tratamento endodôntico em 55 dentes com periodontite apical. Os dentes com cultura negativa após a instrumentação apresentaram sucesso em 94% dos casos, enquanto nos dentes com cultura positiva, o sucesso era de apenas 68%. Os autores ressaltaram que essas bactérias resistentes ao preparo químico-mecânico, se permanecerem viáveis, podem manter a inflamação periapical, sendo um importante fator no insucesso do tratamento endodôntico.

Microrganismos sobreviventes às medidas de desinfecção podem morrer ou manter-se viáveis, dependendo da quantidade de nutrientes disponíveis e da capacidade de sobreviver em condições de carência nutricional. Os microrganismos que permaneceram viáveis somente resultarão em fracasso se tiverem acesso aos tecidos periapicais, se forem

patogênicos e se estiverem em número suficiente para induzir ou perpetuar uma lesão periapical (GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1996b; LOPES *et al.*, 1999).

Mesmo em casos de canais radiculares bem tratados, algumas bactérias podem permanecer vivas, devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares (IDA & GUTMANN, 1995). Bactérias presentes em regiões de istmos, ramificações, reentrâncias, túbulos dentinários, reabsorções apicais externas, podem não ser afetadas pelas medidas usadas no controle de infecção endodôntica (NAIR *et al.*, 1987, 1990a, 1999).

NAIR *et al.* (1990a) detectaram a presença de bactérias e fungos nos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico. Os autores analisaram 9 dentes utilizando a microscopia óptica e eletrônica de transmissão, e verificaram a presença de microrganismos em 6 casos, 4 contendo bactérias e 2 contendo fungos. Os microrganismos foram detectados em deltas apicais e reabsorções radiculares, em canais laterais não obturados que apresentavam comunicação com o forame apical, e entre o material obturador e as paredes dentinárias dos canais radiculares. Os resultados sugeriram que a maioria dos dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais resistentes ao tratamento convencional, pode conter microrganismos persistentes, que podem desempenhar um papel significativo do fracasso do tratamento endodôntico.

Em uma minoria dos casos, segundo CHEUNG (1996), o insucesso endodôntico pode estar relacionado a uma infecção extracanal. Estudos têm demonstrado a presença de bactérias na superfície externa radicular (TRONSTAD *et al.*, 1990; MOLVEN *et al.*, 1991; KIRYU *et al.*, 1994; LOMÇAH *et al.*, 1996; HARN *et al.*, 1998) ou na lesão periapical (SUNDQVIST & REUTERVING, 1980; NAIR *et al.*, 1987; TRONSTAD *et al.*, 1987; SJÖGREN *et al.*, 1988; IWU *et al.*, 1990; WAYMAN *et al.*, 1992; WASFY *et al.*, 1992; ABOU-RASS & BOGEN, 1998).

Segundo SIQUEIRA JR. & LOPES (1999), poucas espécies bacterianas são capazes de sobreviver no interior dos tecidos perirradiculares, tornando-se, assim, responsável pelo insucesso do tratamento endodôntico. A sobrevivência nesta região, onde as defesas do hospedeiro têm maior acesso ao agente infeccioso, somente é possível para os microrganismos dotados da capacidade de anular essas defesas (SIQUEIRA JR., 1997).

Estudos têm reportado o isolamento de espécies de *Actinomyces israeli* (SUNDQVIST & REUTERVING, 1980; SJÖGREN *et al.*, 1997), *Actinomyces* spp. (NAIR *et al.*, 1984) e “*Arachnia propionica*” (SJÖGREN *et al.*, 1988) de lesões periapicais resistentes ao tratamento endodôntico, caracterizando uma actinomicose periapical. FIDGOR *et al.* (1992), estudando a patogenicidade de espécies de *Actinomyces israeli* e “*Arachnia propionica*” em animais, observaram que uma cepa bacteriana isolada de uma lesão periapical pode formar colônias coesas, com grande número de células, escapando assim coletivamente da fagocitose que deveria ser realizada pelas células de defesa. A espécie “*Arachnia propionica*” foi incluída no gênero *Propionibacterium*, sendo atualmente denominada *Propionibacterium propionicum* (SUNDQVIST, 1994).

Um outro mecanismo bacteriano de evasão às defesas do hospedeiro, é o arranjo em biofilme das bactérias presentes na superfície externa radicular. O biofilme perirradicular é caracterizado por uma população de microrganismos aderidos ao cimento e/ou à dentina na porção apical da raiz, que estão envolvidos por uma camada polissacarídica externa conhecida como glicocálice, a qual forma uma matriz intermicrobiana. A estrutura da matriz polissacarídica que envolve o biofilme limita o acesso de moléculas de defesa (anticorpos e complemento) e de células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos) (PALMER & WHITE, 1997; SIQUEIRA & LOPES, 1999).

TRONSTAD *et al.* (1990) analisaram, através da microscopia eletrônica de varredura, a superfície dos ápices radiculares de 10 dentes com tratamento endodôntico prévio e lesões periapicais persistentes que foram submetidos à cirurgia periapical. Os autores verificaram que na região adjacente ao forame apical, nas irregularidades e

reabsorções cementárias, havia uma placa bacteriana formada por uma variedade de formas (predominantemente cocos e bacilos), que eram mantidas juntas por um material extracelular.

HARN *et al.* (1998) relataram um caso de lesão periapical e fistula persistente ao tratamento endodôntico, no qual, no ato cirúrgico, foi verificado um depósito semelhante a um cálculo no ápice da raiz. Os autores sugeriram que o cálculo era originado da calcificação da placa bacteriana da superfície externa apical, representando um meio propício para retenção de bactérias extraradiculares, o que, nesse caso, poderia ter um papel importante na manutenção da inflamação periapical após um tratamento endodôntico bem realizado.

NAKANO-HASEGAWA *et al.* (1999) estudaram *in vitro* a capacidade de microrganismos isolados de canais radiculares infectados de formar o biofilme. Os autores selecionaram para o estudo espécies de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureginosa* e *Candida albicans*, por serem microrganismos de difícil eliminação durante a terapia endodôntica. A capacidade de formação do biofilme foi determinada pela habilidade dos microrganismos de aderirem a um disco de colágeno colocado em um frasco contendo meio de cultura. Fragmentos do disco foram removidos após um período de incubação de 3, 7 e 14 dias e foram examinados através da microscopia eletrônica de varredura. Uma substância semelhante ao glicocálice foi observada em todos microrganismos estudados com exceção da *Candida albicans*. A quantidade da substância semelhante ao glicocálice formada aumentava com o período de incubação. Os autores sugeriram que esses microrganismos tinham a capacidade de formar o biofilme devido à produção de substâncias semelhantes ao glicocálice.

Além dos problemas anatômicos, que consistem em áreas inacessíveis à instrumentação, o fracasso endodôntico pode advir da resistência de determinadas bactérias aos métodos químicos e mecânicos utilizados na terapia endodôntica convencional. GOMES *et al.* (1996b) estudaram a suscetibilidade da microbiota dos canais radiculares aos

procedimentos químico-mecânicos, e relataram que a terapia endodôntica não foi capaz de eliminar completamente as bactérias do sistema de canais radiculares, apresentando algumas espécies mais resistentes ao preparo químico-mecânico do que outras.

Algumas bactérias têm sido relacionadas a infecções endodônticas persistentes após o preparo químico-mecânico, sendo *Enterococcus faecalis* freqüentemente isolados desses canais radiculares (BENDER & SELTZER, 1952; ENGSTRÖM, 1964; GOLDMAN & PEARSON, 1969; CAVALLERI *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1996b). Estudos têm demonstrado a persistência de espécies de *Staphylococcus* após a realização do preparo químico-mecânico dos canais radiculares (GOLDMAN & PEARSON, 1969; GOMES *et al.*, 1996b). Bacilos entéricos Gram-negativos, incluindo espécies de *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* (HAAPASALO *et al.*, 1983), espécies de *Pseudomonas aureginosa* (RANTA *et al.*, 1988) e fungos (WALTIMO *et al.*, 1997) foram isolados em casos de infecções que não responderam adequadamente aos procedimentos químico-mecânico durante o tratamento endodôntico convencional, geralmente com persistência de exsudato e dor à percussão.

Segundo SIREN *et al.* (1997), as bactérias entéricas não estão presentes comumente na microbiota de canais radiculares infectados. Essa diferença da composição da microbiota de dentes com infecções persistentes pode ser devido a dois fatores: a presença de uma pequena quantidade de bactérias entéricas na infecção original do canal radicular, que aumenta sua proporção durante o tratamento endodôntico devido a maior suscetibilidade de outras bactérias à terapia endodôntica; ou bactérias entéricas podem entrar no canal radicular durante o tratamento endodôntico devido a um isolamento inadequado do campo de trabalho, a uma infiltração pelo material restaurador temporário, ou quando um canal é deixado aberto para drenagem. Com o objetivo de estudar a relação entre os procedimentos clínicos e a presença de bactérias entéricas facultativas, os autores realizaram coletas microbiológicas dos canais radiculares durante diferentes procedimentos ao longo do tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram que *Enterococcus faecalis*, outras bactérias entéricas facultativas (*Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.) e *Pseudomonas* spp.



foram encontradas mais freqüentemente em casos onde os canais radiculares não foram selados em algum ponto do tratamento endodôntico, ou em casos com grande número de sessões. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais freqüentemente isolada. Os autores enfatizaram a importância do controle da cadeia asséptica durante a terapia endodôntica no prognóstico do tratamento.

O insucesso do tratamento endodôntico tem sido relacionado à ausência de um selamento coronário adequado após o tratamento endodôntico. Trabalhos demonstram que bactérias e seus produtos podem penetrar nas falhas marginais de uma restauração defeituosa e na interface entre o material obturador e o canal radicular, e atingir a região periapical (CHEUNG, 1996).

SWARTZ *et al.* (1983), avaliando os fatores de sucesso e insucesso de 1.007 dentes tratados endodonticamente, relataram que dentes com restaurações coronárias impróprias ou ausentes apresentavam um índice de sucesso significativamente menor quando comparado aos dentes com restaurações adequadas.

RAY & TROPE (1995) investigaram 1.010 dentes tratados endodonticamente e restaurados com o objetivo de avaliar a relação entre a qualidade da restauração coronária e da obturação do canal radicular no índice de sucesso do tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram que tratamentos endodônticos e restaurações coronárias de boa qualidade resultaram em um sucesso de 94%; tratamentos endodônticos adequados e restaurações defeituosas, o índice caía para 44,1%; tratamentos endodônticos com falhas e boas restaurações coronárias, o índice de sucesso era de 67,6%; e tratamento endodônticos e restaurações inadequadas, um baixo índice de 18,1%. Os autores concluíram que a qualidade da restauração coronária definitiva era significativamente mais importante do que a qualidade técnica do tratamento endodôntico para manutenção da saúde periapical de dentes tratados endodonticamente.

TORABINEJAD *et al.* (1990) estudaram *in vitro* a infiltração bacteriana em 45 dentes tratados endodonticamente e não selados, expostos a espécies de *Staphylococcus epidermidis* e *Proteus vulgaris*, e observaram que 50% dos canais estavam completamente contaminados por *Staphylococcus epidermidis* após 19 dias, e por *Proteus vulgaris* após 42 dias.

ALVES *et al.* (1996) demonstraram que as endotoxinas bacterianas penetravam mais rapidamente do que as bactérias nas obturações dos canais radiculares. Os autores utilizaram dentes anteriores extraídos, que foram instrumentados, obturados e preparados para o espaço protético, deixando 5 mm de guta-percha, e introduzidos em um dispositivo que deixava a câmara pulpar em contato com as bactérias, e o ápice radicular em contato com um meio de cultura. Uma solução contendo uma cultura mista de bactérias em um meio rico em nutrientes, em contato com a câmara pulpar, era trocada a cada três dias. Amostras do meio de cultura em contato com o ápice radicular, eram coletadas para detecção da infiltração de endotoxinas e bactérias. A infiltração de endotoxinas ocorreu após 9 dias, e a infiltração bacteriana não foi detectada até o 35º dia.

MAGURA *et al.* (1991), estudando a microinfiltração coronária *in vitro* de saliva humana em dentes tratados endodonticamente através da infiltração de corantes e da análise histológica, verificaram que a infiltração após 90 dias foi significativamente maior do que os outros períodos estudados (2, 7, 14 e 28 dias). Os autores sugeriram a realização do retratamento endodôntico em dentes sem restaurações coronárias e expostos ao meio bucal por três meses ou mais.

LAGE-MARQUES *et al.* (1996) avaliando 1.805 dentes tratados endodonticamente, observaram que 25,7% dos casos apresentavam restaurações temporárias, um fator crítico no sucesso desses tratamentos. Estudos têm demonstrado que os materiais restauradores temporários não oferecem um selamento coronário adequado, permitindo infiltração de bactérias (KELLER *et al.*, 1981; DEVEAUX *et al.*, 1992; IMURA *et al.*, 1997; BARTHEL *et al.*, 1999).

IMURA *et al.* (1997), estudando *in vitro* a penetração das bactérias da saliva através do material restaurador temporário em dentes tratados endodonticamente, relataram que a média do tempo para a infiltração bacteriana em toda extensão do canal radicular obturado foi de 9,8 dias para dentes selados com Cavit e 12,95 dias para o grupo do IRM.

BARTHEL *et al.* (1999) estudaram *in vitro* a infiltração de *Streptococcus mutans* em 103 dentes tratados endodonticamente e selados com diferentes materiais restauradores temporários. A média do tempo de infiltração da bactéria até a região apical da obturação radicular foi de 4,5 dias para o grupo do Cavit, 4 dias para o IRM e 2 dias para o grupo restaurado com ionômero de vidro. Os autores recomendaram que a restauração definitiva fosse realizada o mais rápido possível após a obturação dos canais radiculares.

#### *Fatores não-microbianos*

Embora os microrganismos sejam os principais agentes etiológicos dos casos de fracasso da terapia endodôntica, outros fatores independentes podem afetar adversamente o prognóstico do tratamento endodôntico (NAIR *et al.*, 1999).

NAIR *et al.* (1990b) relataram um caso de reação de corpo estranho dos tecidos periapicais a um material obturador dos canais radiculares. O estudo consistiu na biópsia de uma lesão periapical assintomática persistente após o tratamento endodôntico, que foi verificada através de microscopia óptica e eletrônica de varredura. A única característica da lesão era a presença de células multi-nucleadas semelhantes a células gigantes da reação de corpo estranho, e a presença de magnésio e silicone, que foram considerados remanescentes do excesso do material obturador do tratamento endodôntico prévio.

LIN *et al.* (1991), em seu estudo, relataram que tecidos necróticos e materiais obturadores nocivos poderiam agir como irritantes, causando uma inflamação periapical. Os autores também encontraram casos diagnosticados como cistos apicais, que foram considerados fatores de insucesso.

NAIR *et al.* (1993), através da análise, em microscopia óptica e eletrônica de varredura, da biópsia de uma lesão que não regrediu após o tratamento endodôntico, relataram que a lesão foi diagnosticada como cisto e apresentava um grande número de cristais de colesterol no tecido conjuntivo que circundava o revestimento epitelial da loja cística. Uma vez que microrganismos não foram detectados, os autores atribuíram a causa da persistência da lesão a fatores endógenos, como o acúmulo de cristais de colesterol e a própria condição cística da lesão.

NAIR *et al.* (1999), no estudo de biópsias de 6 lesões periapicais persistentes ao tratamento endodôntico, encontraram 2 casos com infecções persistentes no interior do sistema de canais radiculares, um caso de cisto, 2 casos de tecido fibroso denominado cicatriz apical, e um granuloma. Os autores confirmaram estudos prévios de que infecção intraradicular e cistos periapicais são causas importantes do insucesso endodôntico, porém, algumas radioluscências periapicais podem ocasionalmente ser devido à cura.

## **MICROBIOTA DE DENTES TRATADOS ENDODONTICAMENTE ASSOCIADOS A LESÕES PERIAPICAIS**

Informações sobre a natureza das infecções dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio e lesões periapicais persistentes são escassas. Porém, estudos têm revelado que a microbiota de dentes com fracasso do tratamento endodôntico (MÖLLER, 1966; MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998) difere marcadamente daquela encontrada em canais radiculares de dentes com polpas necrosadas e não tratados endodonticamente (SUNDQVIST *et al.*, 1989; BAUMGARTNER, 1991; BAUMGARTNER & FALKER, 1991; SUNDQVIST, 1992a,b; SATO *et al.*, 1993; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996a,b,c; BAUMGARTNER *et al.*, 1999).

Vários estudos demonstraram que a infecção de canais radiculares com polpas necrosadas e não-tratados, caracteriza-se pela presença de uma microbiota mista e

polimicrobiana, comumente em combinações de 4 a 7 espécies, predominantemente anaeróbia estrita, com um relativo equilíbrio entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium*, são freqüentemente isoladas de canais radiculares infectados (SUNDQVIST, 1989, 1992a,b; BAUMGARTNER, 1991; BAUMGARTNER & FALKER, 1991; SATO *et al.*, 1993; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996a,b,c).

MÖLLER (1966), realizando um estudo microbiológico de 654 canais radiculares de dentes com polpas vitais, polpas necróticas e com tratamento endodôntico prévio associado a lesões periapicais, relatou que a microbiota de dentes com fracasso da terapia endodôntica era composta por um número menor de microrganismos quando comparada aos dentes com polpas necróticas, apresentando uma média de 1,6 espécie bacteriana por canal. Dos 264 dentes estudados com tratamento endodôntico prévio, 120 (45,5%) apresentaram culturas positivas. Os autores relataram que havia um equilíbrio entre as bactérias anaeróbias facultativas e estritas, com as últimas correspondendo a 51% do total das bactérias isoladas, e um predomínio de bactérias Gram-positivas, compreendendo 80% dos isolados. Espécies dos gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Lactobacillus* e *Eubacterium*, foram isoladas freqüentemente; enquanto *Prevotella* e *Fusobacterium* foram menos freqüentes. *Enterococcus faecalis* foi isolado em 29% dos casos que apresentavam culturas positivas.

ENGSTRÖM (1964), investigando a presença de *Enterococcus* spp. nas infecções endodônticas, verificou que estavam presentes em 20,9% das amostras de dentes com tratamento endodôntico prévio, enquanto representavam 12,1% das amostras de polpas necrosadas. O autor ressaltou, em seu trabalho, a dificuldade em eliminar esses microrganismos dos canais radiculares, constituindo um problema na terapêutica endodôntica.

Espécies de *Enterococcus* pertenciam anteriormente ao gênero *Streptococcus*, classificadas como estreptococos do Grupo D de Lancefield. Trabalhos da década de 60 e 70 (MÖLLER, 1966; MIRANDA, 1969; NORD & WADSRÖM, 1973; HEINTZ *et al.*, 1975) referiam-se a espécies de *Streptococcus faecalis*, que atualmente são denominadas *Enterococcus faecalis* (ROSAN, 1997).

MOLANDER *et al.* (1998) analisaram o estado microbiológico de 100 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical visível radiograficamente. Os dentes estudados apresentavam-se assintomáticos, e com a obturação do canal apresentando uma distância máxima de 5 mm aquém do ápice radiográfico. A remoção do material obturador foi realizada utilizando brocas de Gates-Glidden e limas endodônticas, e em 21 casos, foi utilizado clorofórmio como material solvente da guta-percha. Os resultados mostraram que bactérias estavam presentes em 68 dentes, porém o uso do clorofórmio foi considerado um fator influente, diminuindo o crescimento bacteriano. Dos 21 casos onde foi utilizado o clorofórmio, houve crescimento bacteriano em apenas 10 casos (47,3%), enquanto nos 79 dentes restantes o crescimento foi detectado em 58 canais (73,4%). Um total de 117 amostras microbianas foi isolado, com 114 bactérias e 3 fungos. A maioria dos canais continha uma ou duas espécies bacterianas (85% dos casos). As bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas predominaram, constituindo 69% das espécies isoladas. Os microrganismos isolados foram: *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp., bacilos Gram-positivos anaeróbios, bacilos Gram-negativos facultativos, *Veillonella* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp. e *Candida* spp. *Enterococcus* foi o gênero bacteriano mais freqüentemente isolado, presente em 47% dos canais com bactérias. Os autores concluíram que a microbiota dos dentes tratados endodonticamente diferenciava, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, dos dentes com polpas necrosadas.

SUNDQVIST *et al.* (1998) realizaram coletas microbiológicas de 54 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com lesões periapicais visíveis radiograficamente. Todos os dentes, com exceção de 1 com obturação defeituosa, apresentavam a obturação

dos canais com um padrão radiográfico razoável. A técnica do retratamento foi realizada sem o uso de solventes da guta-percha. O crescimento bacteriano foi detectado em 24 casos, sendo caracterizado por monoinfecções de microrganismos predominantemente Gram-positivos (87% das bactérias isoladas), com proporções aproximadamente iguais de bactérias anaeróbias facultativas (58%) e estritas (42%). Os gêneros isolados foram: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* e *Bacteroides*. *Candida* spp. foi detectada em 2 casos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüente, isolada em 38% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias.

O número limitado de microrganismos encontrados nos dentes tratados endodonticamente deve-se a fatores de seleção que determinam a persistência das bactérias capazes de resistir aos procedimentos antimicrobianos e medicamentos utilizados na terapia endodôntica, e de sobreviver em um meio escasso de nutrientes (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

Geralmente as bactérias anaeróbias facultativas são mais resistentes à atividade antimicrobiana do que as anaeróbias estritas, podendo persistir mais freqüentemente em canais radiculares após a terapia endodôntica. Os microrganismos anaeróbios facultativos podem permanecer em uma fase latente, com uma baixa atividade metabólica por um período, e mudanças das condições ambientais, como uma infiltração coronária, podem ativar o seu crescimento (MOLANDER *et al.*, 1998).

*Enterococcus faecalis*, microrganismos freqüentemente isolados de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico (MÖLLER, 1966; MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998), representam uma proporção pequena da microbiota inicial de dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais (SUNDQVIST *et al.*, 1992; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1996a). *Enterococcus faecalis*, que são cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, têm demonstrado resistência aos procedimentos endodônticos de desinfecção durante o preparo químico-mecânico (GOMES *et al.*, 1996b;

SUNDQVIST *et al.*, 1998), e a capacidade de sobreviver em canais radiculares como microrganismos únicos sem a relação cooperativa de outras bactérias (FABRICIUS *et al.*, 1982; SUNDQVIST *et al.*, 1998).

SIREN *et al.* (1997) demonstraram que *Enterococcus faecalis* podem penetrar no canal pela infiltração coronária, resistir ao tratamento e persistir após a obturação dos canais. Os autores relataram que os canais que continham espécies de *Enterococcus faecalis* resultaram em um maior número de casos com insucessos, necessitando de retratamento endodôntico, quando comparados com os dentes que não apresentavam essas bactérias na sua microbiota.

SUNDQVIST *et al.* (1998) analisaram, em seu trabalho, a taxa de sucesso/insucesso dos dentes que foram submetidos ao retratamento, e verificaram que de 9 canais que continham *Enterococcus faecalis* na cultura inicial, 3 (33,3%) apresentaram a persistência desse microrganismo após o preparo químico-mecânico com hipoclorito de sódio a 0,5% e curativo com pasta de hidróxido de cálcio (Calasept), e resultaram em insucesso após um período de preservação de 4 anos.

READER *et al.* (1994) isolaram *Staphylococcus aureus*, como microrganismo único, após incubação anaeróbia e aeróbia do exsudato de um dente com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical persistente.

HAAPASALO *et al.* (1983), realizando a investigação microbiológica de um dente com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical, isolaram *Enterobacter cloacae*, um bacilo Gram-negativo facultativo, como microrganismo único presente no canal radicular. Os autores relataram que esse microrganismo era um bacilo entérico ocasionalmente encontrado no canal radicular, porém quando isolado, parecia estar associado a infecções endodônticas persistentes. Os autores, discutindo a via de entrada dos bacilos entéricos Gram-negativos nos canais radiculares, citaram a contaminação através de instrumentos manipulados com as mãos, de soluções irrigadoras não-estéreis, e de canais deixados em comunicação com a cavidade oral.



A presença de fungos no canal radicular também pode ser resultado de contaminação durante o tratamento endodôntico (WALTIMO *et al.*, 1997), e pode estar associada ao insucesso de dentes tratados endodonticamente (NAIR *et al.*, 1990; MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998). WALTIMO *et al.* (1997), estudando os microrganismos isolados de 692 amostras de canais radiculares com persistência de infecções após o preparo químico-mecânico, isolaram fungos em 48 amostras (7% dos casos), sendo *Candida albicans* a espécie mais isolada dos canais radiculares. Os fungos têm demonstrado resistência a medicamentos comumente usados no processo de desinfecção endodôntica (WALTIMO *et al.*, 1999). Esses microrganismos, assim como as espécies de *Enterococcus faecalis*, parecem ter a habilidade de utilizar oportunidades criadas pela remoção de outros microrganismos, e também ter capacidade de viver em um meio pobre em nutriente, como o canal do dente tratado endodonticamente (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

O número de espécies bacterianas isoladas de casos de retratamento está provavelmente relacionado à qualidade do tratamento endodôntico inicial. Dentes com tratamentos endodônticos de má qualidade, isto é, dentes com obturações muito aquém do ápice ou com falhas, apresentam uma microbiota similar àquela encontrada nos dentes não-tratados, os quais contêm um maior número de espécies bacterianas (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

TANI *et al.* (1992) isolaram bactérias dos canais radiculares de 40 dentes com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical. Todos pacientes tinham dor à percussão e palpação, e radiograficamente todos os canais envolvidos revelaram obturações deficientes. As bactérias isoladas incluíam: *Bacteroides* spp., *Veillonella parvula*, *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus anaerobius*, *Clostridium* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus plantarum* e *Propionibacterium propionicum*.

GOMES *et al.* (1996a), com o objetivo de estudar a microbiota dos canais radiculares e sua associação com sinais e sintomas clínicos, realizaram coletas microbiológicas de 70 canais infectados, dos quais, 21 apresentavam tratamento endodôntico prévio e, em sua maioria, a presença de dor. *Propionibacterium* foi o gênero mais freqüentemente isolado nos canais com tratamento endodôntico prévio. Entretanto, espécies anaeróbias pertencentes ao gênero *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, assim como espécies facultativas como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*, também foram isoladas. Neste estudo os autores verificaram a associação de dor com espécies de *Prevotella spp.* e *Peptostreptococcus spp.*, o que foi confirmado em outro trabalho (GOMES *et al.*, 1996c).

Os gêneros *Propionibacterium* e *Actinomyces* têm sido associados a lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico (SUNDQVIST & REUTERVING, 1980; NAIR *et al.*, 1984; SJÖGREN *et al.*, 1988, 1997). Essas bactérias se apresentam menos suscetíveis aos procedimentos químicos e mecânicos durante a terapia endodôntica (GOMES *et al.*, 1996b; SJÖGREN *et al.*, 1997), e, uma vez instalados no canal radicular, podem atingir os tecidos periapicais e sobreviver fora do canal radicular, causando infecções que só podem ser removidas cirurgicamente (SUNDQVIST & REUTERVING, 1980; NAIR *et al.*, 1984; SJÖGREN *et al.*, 1988, 1997).

SJÖGREN *et al.* (1997), com o objetivo de investigar o papel da infecção no prognóstico do tratamento endodôntico, realizaram coletas microbiológicas de 55 dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais antes e após o preparo químico-mecânico. Após a realização das coletas microbiológicas, os canais foram obturados na mesma sessão, e foram preservados por um período de 5 anos. Após a realização da instrumentação, 22 canais continham bactérias, dos quais 7 (32%) apresentaram insucesso endodôntico, com persistência da lesão periapical. Os autores verificaram que 2 casos que resultaram em fracasso endodôntico, apresentavam *Actinomyces israelii* nos canais radiculares no momento da obturação. A análise histológica das lesões periapicais desses dentes revelou a presença dessa bactéria nos tecidos periapicais, caracterizando uma actinomicose periapical.

SUNDQVIST *et al.* (1998) relacionaram um caso de lesão periapical persistente após o retratamento endodôntico, com a presença de *Actinomyces israelii* no canal no momento da obturação, mesmo após a instrumentação e curativo com pasta de hidróxido de cálcio (Calasept).

FUKUSHIMA *et al.* (1990) localizaram e identificaram bactérias de 21 dentes tratados endodonticamente com lesão periapical, assintomáticos, através da coleta dos ápices de dentes extraídos. Após a extração, 5 mm do ápice radicular foram cortados transversalmente e depois longitudinalmente. Uma das partes do ápice foi estudada na microscopia eletrônica de varredura e a outra foi fragmentada em pequenos pedaços e colocadas em um meio de transporte, sendo processada para o isolamento e cultivo de bactérias anaeróbias. Bactérias foram isoladas em 13 (60%) dos 21 dentes. Bactérias anaeróbias estritas estavam presentes em 12 casos, e as anaeróbias facultativas em 8. Foram identificadas espécies anaeróbias dos gêneros: *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* e *Veillonella*. Entre as bactérias facultativas, *Lactobacillus*, *Streptococcus* e *Enterococcus* foram os gêneros mais prevalentes. *Enterococcus faecalis* estava presente em 3 casos. Os autores sugeriram que essa alta proporção de anaeróbios em dentes tratados endodonticamente e assintomáticos era devido à técnica de coleta através da fragmentação de ápices de dentes extraídos, pois a coleta do canal radicular pode não refletir a total composição da microbiota no ápice radicular.

## **TRATAMENTO DO INSUCESSO ENDODÔNTICO**

As principais modalidades de tratamento dos insucessos endodônticos são o retratamento convencional e a cirurgia periapical (FRIEDMAN & STABHOLTZ, 1986; HEPWORTH & FRIEDMAN, 1997; BRIGGS & SCOTT, 1997). Cada modalidade apresenta vantagens e riscos específicos, o que exige uma análise criteriosa da situação clínica, para optar pelo tratamento mais indicado (FRIEDMAN & STABHOLTZ, 1986).

O retratamento endodôntico consiste em realizar a remoção do material obturador, a reinstrumentação e reobturação do sistema de canais radiculares, com o objetivo de superar as deficiências da terapia anterior. O retratamento busca obter, radiograficamente, uma imagem que revele uma obturação adequada do canal radicular, quanto à compactação e ao limite apical, permitindo supor uma favorável evolução quanto à reparação tecidual (LOPES *et al.*, 1999).

Como a maioria dos fracassos endodônticos resulta de uma proliferação bacteriana dentro do canal do dente com tratamento endodôntico prévio, a razão para se realizar o retratamento convencional, isto é, a desinfecção do sistema de canais radiculares, obedece tanto aos princípios biológicos quanto aos princípios técnicos que regem a terapia endodôntica (HEPWORTH & FRIEDMAN, 1997).

Estudos indicam o retratamento convencional como primeira opção de tratamento nos casos de insucesso (HEPWORTH & FRIEDMAN, 1997; BRIGGS & SCOTT, 1997; RUDDLE, 1997). Nos casos em que o acesso ao canal não for possível ou em casos em que o retratamento convencional fracassou, o tratamento é a cirurgia periapical (FRIEDMAN & STABHOLTZ, 1986; HEPWORTH & FRIEDMAN, 1997; BRIGGS & SCOTT, 1997; RUDDLE, 1997). É importante ressaltar que a realização do retratamento convencional, antes da cirurgia periapical, aumenta o índice de sucesso da mesma (HEPWORTH & FRIEDMAN, 1997; BRIGGS & SCOTT, 1997).

A cirurgia periapical oferece um acesso imediato ao ápice radicular. Nesse procedimento, é possível realizar a limpeza dos tecidos ao redor do ápice; a apicectomia para remoção de 2 a 3 mm do ápice, que freqüentemente contém ramificações dos canais com infecção; e a obturação retrógrada para um bom selamento (HEPWORTH & FRIEDMAN, 1997; BRIGGS & SCOTT, 1997).

Os índices de sucesso das duas modalidades de tratamento, retratamento convencional e cirúrgico, são semelhantes, não apresentando diferenças estatísticas nos estudos realizados (ALLEN *et al.*, 1989; HEPWORTH & FRIEDMAN, 1997). ALLEN *et al.* (1989), analisando retrospectivamente 633 casos, mostraram que a taxa de sucesso do retratamento convencional era de 72,7%, e o cirúrgico com obturação retrógrada era de 60%. HEPWORTH & FRIEDMAN (1997), em uma revisão da literatura, estimaram uma média de sucesso de 66% e 59% dos retratamentos não-cirúrgicos e cirúrgicos, respectivamente.

SJÖGREN *et al.* (1990) reportaram uma taxa de sucesso de 62% em casos de retratamento endodôntico de dentes com lesões periapicais. Entretanto, verificaram sucesso do tratamento endodôntico em 86% dos dentes com polpa necrosada e lesão periapical, e em 96% dos dentes com polpas vitais e não-vitais sem lesão periapical.

VAN NIEUWENHUYSEN *et al.* (1994) e SUNDQVIST *et al.* (1998) relataram um índice de sucesso de 78% e 74%, respectivamente, em casos de retratamentos endodônticos convencionais.

A menor taxa de sucesso do retratamento endodôntico, quando comparado ao tratamento endodôntico de polpas necrosadas, tem sido relacionada a dificuldades técnicas devido a fatores iatrogênicos cometidos no tratamento endodôntico anterior (LEWIS & BLOCK, 1988). MOLANDER *et al.* (1998) ressaltaram que essas baixas taxas de sucesso podem indicar uma dificuldade na eliminação da microbiota presente nos dentes com tratamento endodôntico prévio, que representa um grupo limitado de microrganismos altamente resistentes à terapêutica do retratamento endodôntico. Os autores concluíram em seu estudo que as estratégias do retratamento convencional deveriam ser reconsideradas, e sugeriram que fossem realizados mais estudos sobre a microbiota de dentes tratados endodonticamente, sua composição e suscetibilidade a substâncias medicamentosas utilizadas no tratamento, com o objetivo de elevar os índices de sucesso.

## O USO DE ANTIBIÓTICOS SISTÊMICOS COMO COMPLEMENTO À TERAPÊUTICA DE CASOS DE INSUCESSOS ENDODÔNTICOS

A razão para o uso de antibióticos sistêmicos se baseia em cinco fatores: indicação apropriada, habilidade da droga de alcançar o sítio de infecção em concentrações adequadas, eficácia da droga contra os microrganismos, efeitos adversos mínimos ao paciente, e estado do sistema imune do paciente (WALKER, 1992; GRAD, 1997).

O uso de antibióticos por via sistêmica, nos casos de infecções endodônticas, está indicado apenas quando infecções periapicais agudas apresentam sinais de disseminação do processo infeccioso, ou sinais e sintomas de ordem sistêmica (ABBOTT *et al.*, 1990; GRAD, 1997; ANDRADE, 1999).

Infecções crônicas geralmente não requerem terapia antibiótica, exceto durante uma exarcebação aguda (ABBOTT *et al.*, 1990). Os autores explicam que lesões periapicais crônicas estão associadas a dentes com polpas necrosadas ou com tratamento endodôntico prévio, que não possuem suprimento sanguíneo. Logo, quando um antibiótico é administrado por via sistêmica, a concentração de antibiótico que alcança o local de infecção, ou seja, o canal radicular, é insignificante e insuficiente para inibir o crescimento bacteriano.

Embora antibióticos de uso sistêmico não sejam normalmente utilizados no tratamento de lesões periapicais crônicas, em pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana eles se tornam um importante complemento à terapêutica endodôntica, sendo utilizados em regimes profiláticos (ABBOTT *et al.*, 1990; GRAD, 1997).

DEBELIAN *et al.* (1995), com o objetivo de estudar a bacteremia associada ao tratamento endodôntico, realizaram coletas microbiológicas de 26 canais radiculares associados a periodontites apicais crônicas antes da instrumentação, e coletas sanguíneas

durante e 10 minutos após a instrumentação endodôntica. Microrganismos anaeróbios foram isolados de todos os canais radiculares e de 11 coletas sanguíneas. As espécies microbianas isoladas da corrente sanguínea foram: *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Actinomyces israelii*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus sanguis*. Testes bioquímicos e antibiogramas revelaram que os isolados dos canais radiculares e do sangue tinham o mesmo padrão. Os resultados demonstraram que os microrganismos encontrados no sangue tinham como fonte o canal radicular.

Em pacientes de risco, a profilaxia antibiótica é recomendada nos seguintes procedimentos endodônticos, de acordo com as recomendações preconizadas pela *American Heart Association*: instrumentação (além do ápice dental); cirurgia perirradicular e reimplante de dentes avulsionados (DAJANI *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 1998).

ABBOTT *et al.* (1990) advertem que, devido à dificuldade de garantir que toda a instrumentação vai estar confinada no interior do canal radicular, a profilaxia antibiótica deve ser recomendada para todos os pacientes de risco, durante a terapêutica endodôntica.

As condições cardíacas mais associadas à endocardite bacteriana são classificadas de acordo com a *American Heart Association*, em condições de alto risco e risco moderado. As condições cardíacas consideradas de alto risco são: válvulas cardíacas protéticas; endocardite bacteriana prévia; condutos pulmonares sistêmicos construídos cirurgicamente; e doenças cardíacas cianóticas complexas, como estados ventriculares simples, transposição de grandes artérias e tetralogia de Fallot. As de risco moderado, compreendem: a maioria das malformações cardíacas congênitas; disfunção valvular adquirida; cardiomiopatia hipertrófica; prolapso da válvula mitral com regurgitação valvular e/ou espessamento dos folhetos valvulares. Em ambas condições, recomenda-se o regime antimicrobiano profilático para prevenção da endocardite bacteriana (DAJANI *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 1998).

Para o uso correto da profilaxia antibiótica, um dos princípios básicos é o conhecimento dos principais microrganismos causadores da infecção e sua suscetibilidade antimicrobiana (GRAD, 1997).

*Streptococcus viridans* (estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos) ainda são considerados como a causa mais comum de endocardite infecciosa após certas intervenções odontológicas, do trato respiratório superior e do esôfago (DAJANI *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 1998).

Segundo ROSAN (1997), *Streptococcus viridans* é uma designação errônea, porém utilizada até atualmente em alguns artigos. Anteriormente estreptococos eram classificados em três categorias de acordo com a presença ou ausência de hemólise no meio de cultura: 1) estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos eram aqueles que provocavam uma lise incompleta das células vermelhas do sangue, dando um aspecto esverdeado no meio de cultura, sendo portanto denominados *Streptococcus viridans*; 2) estreptococos  $\beta$ -hemolíticos eram os que produziam uma hemólise completa, identificada no meio de ágar sangue como uma zona clara ao redor das colônias bacterianas, e foram denominados *Streptococcus hemolyticus*; e 3)  $\gamma$ -hemolíticos, eram os que não produziam hemólise. Atualmente os estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos ou *Streptococcus viridans* são divididos em uma variedade de espécies: grupo dos *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. oralis*, *S. gordonii*), grupo dos *Streptococcus milleri* (*S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius*), *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus vestibularis*, e *S. salivarius* (GOMES, 1995).

NORD & HEIMDAHL (1990) explicaram que a produção de dextrano, um polissacarídeo extra-celular, pelos *S. mutans* e *S. sanguis*, facilita a adesão na superfície do endocárdio, constituindo um fator de virulência na patogenicidade da endocardite.

Bactérias anaeróbias são consideradas causas incomuns, porém importantes, da endocardite infecciosa (NORD, 1982). Entretanto, estudos têm demonstrado um aumento na incidência de bacteremia por bactérias anaeróbias após procedimentos dentais



(DEBELIAN *et al.*, 1992, 1995; SAPICO & SARMA, 1982; SAPICO & ALDRIDGE, 1993). Segundo DEBELIAN *et al.* (1994), isso se deve à melhoria das técnicas microbiológicas.

O regime profilático padrão recomendado pela *American Heart Association* consiste em uma única dose de amoxicilina, por via oral. Os antibióticos amoxicilina, ampicilina e penicilina são igualmente efetivos, *in vitro*, contra os estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos; entretanto, a amoxicilina é recomendada porque é melhor absorvida pelo trato gastrointestinal, proporcionando níveis séricos maiores e mais duradouros. A dose recomendada é de 2,0 g, para ser administrada 1 hora antes dos procedimentos dentais (DAJANI *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 1998).

Pacientes alérgicos às penicilinas (amoxicilina, ampicilina ou penicilina) devem ser tratados com regimes alternativos. A clindamicina é uma opção recomendada, administrada por via oral, 1 hora antes do procedimento, em uma dose de 600 mg. Azitromicina ou claritromicina também são agentes alternativos para os pacientes alérgicos às penicilinas (DAJANI *et al.*, 1997). Essas drogas são relacionadas quimicamente à eritromicina, mas possuem um nível sérico maior e mais prolongado, um espectro antibacteriano mais amplo, e causam menos efeitos adversos no trato gastrointestinal, quando comparados à eritromicina (CHAMBERS & SANDE, 1995; ANDRADE, 1999).

Segundo DAJANI *et al.* (1997), a eritromicina não está mais incluída nas novas recomendações devido a efeitos adversos no trato gastrointestinal e a farmacocinética complicada das várias formulações.

Cefalexina ou cefadroxil são cefalosporinas, e estão indicadas pelo protocolo da *American Heart Association*, como uma droga alternativa para pacientes alérgicos às penicilinas, desde de que os mesmos não apresentem história de reações alérgicas imediatas às penicilinas (urticária, angioedema e anafilaxia) (DAJANI *et al.*, 1997). Segundo GRAD (1997), devido à possibilidade dos pacientes alérgicos às penicilinas apresentarem

sensibilidade cruzada e desenvolverem reações alérgicas às cefalosporinas e devido à existência de outras opções de profilaxia antibiótica, em pacientes alérgicos às penicilinas, as cefalosporinas só devem ser consideradas se o paciente não poder tomar clindamicina, azitromicina ou claritromicina.

Para pacientes incapazes de fazer uso da droga por via oral, é recomendada a ampicilina por via intra-muscular ou intra-venosa, 30 minutos antes dos procedimentos. Em indivíduos alérgicos às penicilinas, a clindamicina ou a cefazolina estão recomendadas (DAJANI *et al.*, 1997).

### **ANTIBIÓTICOS: MECANISMO DE AÇÃO E RESISTÊNCIA**

O uso indiscriminado dos antibióticos tem levado ao aparecimento de bactérias resistentes aos antimicrobianos (TOMASZ, 1994). O mecanismo de resistência resulta de alterações fisiológicas ou estruturais da célula bacteriana, que representa uma estratégia de sobrevivência ao ataque abusivo dos agentes antimicrobianos (FORBES *et al.*, 1998).

HARRISON (1999) alertou para o problema do surgimento de infecções resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis, que não respondem ao tratamento. FORBES *et al.* (1998) relataram que existiam espécies de *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas aureginosa* para as quais não havia terapia antibiótica eficaz. ROTIMI *et al.* (1999), em seu estudo, encontraram espécies de *Bacteroides* spp. multi-resistentes a drogas comumente utilizadas para tratar infecções anaeróbias.

WALTON & CHIAPPINELLI (1993) condenaram a prática comum de muitos dentistas de prescreverem antibióticos aos pacientes após procedimentos endodônticos, alegando que não há evidência de que o antibiótico reduza a dor ou acelere o processo de cura.

O uso indiscriminado de antibióticos pelo dentista deve ser desencorajado, prevenindo um efeito a longo prazo sobre uma população inteira, especialmente no que diz respeito ao desenvolvimento da resistência bacteriana (ABBOTT *et al.*, 1990).

### ***Penicilinas***

As penicilinas, como um grupo, são os agentes antimicrobianos mais freqüentemente utilizados, e constituem a primeira opção como coadjuvante no tratamento das infecções odontológicas leves ou moderadamente severas, e na prevenção da endocardite bacteriana (GREENBERG *et al.*, 1979; MOENNING *et al.*, 1989; ABBOTT *et al.*, 1990; BAKER & FOTOS, 1994; SANDS *et al.*, 1995; ANDRADE, 1999).

As penicilinas são compostos naturais ou semi-sintéticos, com propriedades diferentes no que diz respeito à sua ação antimicrobiana, podendo apresentar pequeno ou largo espectro de ação biológica (WALKER, 1992; ANDRADE, 1999).

As penicilinas naturais são também conhecidas por benzilpenicilinas ou penicilina G, e são consideradas de pequeno espectro de ação, atuando principalmente sobre os seguintes microrganismos (ANDRADE, 1999):

- a) Cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos: *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus* não produtores de beta-lactamases.
- b) Cocos aeróbios Gram-negativos: *Neisseria*
- c) Anaeróbios Gram-positivos: *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptococcus* e *Peptostreptococcus*.
- d) Anaeróbios Gram-negativos: *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella*, *Porphyromonas*, *Prevotella* e algumas espécies de *Bacteroides* (raramente atinge o *Bacteroides fragilis*). As penicilinas naturais não agem contra espécies produtoras de beta-lactamases.

As penicilinas naturais são inativadas pelo suco gástrico, devendo ser administradas por vias parenterais, ou seja, intramuscular ou intravenosa. A fenoximetilpenicilina potássica ou penicilina V são penicilinas semi-sintéticas resistentes ao ácido gástrico, e permitem a administração do antibiótico por via oral. Seu espectro de ação é idêntico ao das penicilinas G, porém sua melhor absorção oral resulta em uma maior aplicação clínica (WALKER, 1992; ANDRADE, 1999).

A ampicilina e a amoxicilina são classificadas como penicilinas semi-sintéticas de espectro de ação estendido, por inibir a maioria das bactérias sensíveis às penicilinas G e V, e apresentar ação adicional contra bactérias Gram-negativas, especialmente espécies de *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella* e *Proteus mirabilis* (MOENNING *et al.*, 1989; WALKER, 1992; BAKER & FOTOS, 1994).

Apesar de possuírem o mesmo espectro de ação, a ampicilina e a amoxicilina diferem quanto às suas características farmacológicas. A amoxicilina apresenta uma melhor absorção estomacal quando comparado a ampicilina após administração por via oral. Utilizando doses orais semelhantes, a amoxicilina atinge aproximadamente o dobro da concentração da ampicilina no sangue e nos tecidos (WALKER, 1992; ANDRADE, 1999).

DAJANI *et al.* (1994) observaram, após a administração por via oral de uma única dose de 2g de amoxicilina, os picos plasmáticos da droga após 1, 2, 4 e 6 horas, e encontraram, respectivamente, 9,0; 14,5; 10,7 e 3,7 µg/mL. Os autores relataram que as concentrações obtidas eram maiores do que as concentrações necessárias para impedir o crescimento da maioria dos estreptococos da cavidade oral.

Devido à alta concentração e a níveis prolongados da droga no sangue, a amoxicilina é o agente de escolha para a profilaxia antibiótica em pacientes com risco de desenvolvimento da endocardite bacteriana (DAJANI *et al.*, 1997).

As penicilinas fazem parte do grupo dos antibióticos beta-lactâmicos, devido à presença de um anel beta-lactâmico em sua estrutura química. Esses compostos possuem ação bactericida, e agem inibindo a síntese da parede celular (WALKER, 1992; ANDRADE 1999).

FORBES *et al.* (1998), explicando o mecanismo de ação das penicilinas, relatam que o anel beta-lactâmico é a chave do modo de ação dessas drogas, pois se ligam a enzimas envolvidas no processo de síntese da parede celular, inativando-as. Um dos principais componentes dessa parede é a camada de peptidoglicano, cuja síntese ocorre em diversos estágios. Somente a última fase ocorre no exterior da membrana citoplasmática, e corresponde à polimerização dos aminoácidos para formação de cadeias lineares, as quais vão se unir, através do processo denominado transpeptidação, para formar a estrutura protéica final. Esse processo exige a participação de diversas enzimas. Evidências indicam que os antibióticos beta-lactâmicos inativam o processo de transpeptidação por ter afinidade de ligação com essas enzimas, o que resulta em uma ausência de ligação entre as cadeias de peptidoglicana e uma falta de resistência à tensão, acarretando a ruptura da célula bacteriana por pressão osmótica.

O principal mecanismo de resistência de bactérias às penicilinas é a produção de beta-lactamases pelas células bacterianas. As beta-lactamases são enzimas que têm a propriedade de destruir o anel beta-lactâmico de algumas penicilinas, e a estrutura alterada da droga não permite a ligação com as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular, impedindo sua ação bactericida (WALKER, 1992; FORBES *et al.*, 1998; ANDRADE, 1999).

*Staphylococcus* são as bactérias Gram-positivas que mais comumente produzem beta-lactamases, inativando as penicilinas (FORBES *et al.*, 1998). Várias alterações na estrutura dos agentes beta-lactâmicos têm sido desenvolvidas para proteger o anel beta-lactâmico contra a hidrólise enzimática, aumentando a eficácia do antibiótico nos microrganismos produtores de beta-lactamases. As isoxazolil-penicilinas, que compreendem a oxacilina e dicloxacilina, são antibióticos de pequeno espectro, resistentes às beta-lactamases,

indicados quase exclusivamente em infecções estafilocócicas (WALKER, 1992; FORBES *et al.*, 1998; ANDRADE, 1999). Como os *Staphylococcus* não constituem os patógenos primários das infecções odontogênicas, essa droga não está indicada na maioria dos casos (MOENNING *et al.*, 1989).

Entre as bactérias anaeróbias, a produção de beta-lactamases também constitui o principal mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos (RASMUSSEN *et al.*, 1993). Espécies de *Bacteroides fragilis* produzem beta-lactamases em 96% a 100% dos casos (JACOBS *et al.*, 1990).

Segundo JOHNSON (1993), em uma revisão da literatura sobre a suscetibilidade de bactérias anaeróbias a antibióticos beta-lactâmicos nos Estados Unidos, o número de espécies bacterianas capazes de produzir beta-lactamases tem aumentado no decorrer dos anos. Espécies pertencentes aos gêneros *Bacteroides* (outras espécies além dos *Bacteroides fragilis*), *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* têm demonstrado resistência aos antibióticos beta-lactâmicos.

Espécies dos gêneros *Prevotella* e *Porphyromonas* que correspondem aos bacilos anaeróbios produtores de pigmentos negros eram anteriormente incluídas no gênero *Bacteroides*, denominadas “black-pigmented *Bacteroides*”. Estas espécies foram subsequentemente divididas, sendo as espécies pigmentadas de negro assacarolíticas classificadas dentro do gênero *Porphyromonas* e as espécies sacarolíticas dentro do gênero *Prevotella*. As espécies do gênero *Porphyromonas* mais frequentemente isoladas das infecções endodônticas são: *P. asaccharolytica*, *P. endodontalis* e *P. gingivalis*. As espécies pigmentadas do gênero *Prevotella* mais isoladas dos canais radiculares infectados compreendem: *P. corporis*, *P. denticola*, *P. intermedia*, *P. loescheii*, *P. melaninogenica*, e *P. nigrescens* (SUNDQVIST, 1994; GOMES, 1995). Entre as espécies não-pigmentadas do gênero *Prevotella*, foram isolados dos canais radiculares espécies de: *P. bivia*, *P. buccae*, *P. buccalis*, *P. disiens*, *P. oralis*, *P. oris*, *P. oulora*, *P. veroralis* (GOMES, 1995).

Uma estratégia terapêutica é a associação de substâncias inibidoras das beta-lactamases às penicilinas. O clavulanato de potássio, sal potássico do ácido clavulânico, exerce uma ação inibitória das beta-lactamases, se unido irreversivelmente a estas enzimas e inativando-as, tornando o microrganismo sensível às penicilinas que normalmente eram suscetíveis à ação das beta-lactamases, estendendo assim de forma efetiva o espectro de ação antibiótica das penicilinas (WALKER, 1992; FORBES *et al.*, 1998; ANDRADE, 1999).

APPELBAUM *et al.* (1990) estudaram a produção de beta-lactamases e a suscetibilidade antimicrobiana a diversos antibióticos de 320 espécies do gênero *Bacteroides* não pertencentes ao grupo dos *B. fragilis* (neste estudo os autores incluem nesse grupo espécies de “black-pigmented *Bacteroides*”, atualmente denominados de *Prevotella* e *Porphyromonas*) e 129 espécies bacterianas do gênero *Fusobacterium*, em 28 centros dos Estados Unidos. Os autores relataram que 64,7% das espécies do gênero *Bacteroides* e 41,1% do *Fusobacterium* eram beta-lactamases positivas. Neste estudo, o ácido clavulânico aumentou significativamente a atividade antimicrobiana da amoxicilina. Enquanto somente 45,9% das espécies produtoras de beta-lactamases foram suscetíveis *in vitro* à amoxicilina sozinha, 90,4% foram suscetíveis à associação da amoxicilina ao ácido clavulânico. Os autores concluíram que embora a resistência às penicilinas tenha aumentado entre espécies estudadas, as penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamases (amoxicilina + ácido clavulânico) continuam altamente efetivas contra essas bactérias.

CULLMANN *et al.* (1993) investigaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias pertencentes aos gêneros *Bacteroides* (incluindo *Bacteroides fragilis*), *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Actinomyces*, *Propionibacterium*, e *Veillonella*, utilizando diversos antibióticos. Os resultados demonstraram que as espécies de *Bacteroides* foram as mais resistentes, e o composto mais ativo contra as bactérias isoladas foi a combinação das penicilinas com inibidores de beta-

lactamases. As bactérias Gram-positivas foram amplamente sensíveis à maioria dos antibióticos testados.

Segundo FORBES *et al.* (1998) outro mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos antibióticos beta-lactâmicos é a diminuição de absorção da droga pela célula bacteriana. Esse mecanismo não é possível nas bactérias Gram-positivas, pois o antibiótico alcança diretamente as enzimas para impedir a síntese da parede celular. As bactérias Gram-negativas porém, possuem uma membrana externa que cobre a parede celular, pela qual o antibiótico vai ter que passar para atingir o seu alvo. Mudanças no número e características dos poros da membrana externa podem reduzir a entrada do antibiótico e contribuir para a resistência. Esse mecanismo, associado à presença de beta-lactamases no espaço periplasmático, podem resultar em níveis clinicamente relevantes de resistência das bactérias Gram-negativas.

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos também pode ser adquirida quando as bactérias alteram o alvo onde antibiótico vai agir. Nesse mecanismo, o microrganismo muda, ou adquire de outro microrganismo, os genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular. Essas novas enzimas, derivadas de mutações genéticas, continuam sua função mesmo na presença do antibiótico beta-lactâmico, geralmente porque esses não apresentam afinidade suficiente por essas enzimas (FORBES *et al.*, 1998).

Esse é o mecanismo pelo qual espécies de *Staphylococcus* podem apresentar resistência às penicilinas (ao grupo das penicilinas resistentes às beta-lactamases) e a outros agentes beta-lactâmicos. Esse mecanismo também é responsável pela resistência aos beta-lactâmicos observadas entre espécies de *Enterococcus* e algumas espécies de *Streptococcus pneumoniae* e estreptococos *viridans* (FORBES *et al.*, 1998).

Segundo o Conselho de Assuntos Científicos da ADA (*American Dental Association*), em sua reunião em 1997, a resistência aos antibióticos tem aumentado em uma taxa alarmante. A resistência à penicilina de *Streptococcus pneumoniae* tem crescido de



praticamente zero, há poucos anos atrás, a 25% a 60% de todas espécies isoladas. Essa resistência à penicilina tem aumentado também entre espécies de estreptococos *viridans*.

HUNT & MEYER (1983) coletaram espécimes de infecções odontogênicas no período de 1978 a 1981, e constataram que, em contraste com os resultados de 1978, onde não foi encontrada nenhuma espécie de estreptococos *viridans* resistente à penicilina, as últimas espécies isoladas no estudo apresentaram resistência à penicilina em aproximadamente 15% dos casos.

Estreptococos *viridans* requerem teste de suscetibilidade antimicrobiana quando implicam em risco de endocardites (FORBES *et al.*, 1998). PARILLO *et al.* (1979) relataram dois casos em que estreptococos *viridans* resistentes às penicilinas produziram endocardites em pacientes que receberam o regime profilático com estas drogas.

Estreptococos resistentes às penicilinas podem estar presentes na cavidade oral de pacientes que fazem uso constante das penicilinas, como nos casos de prevenção da febre reumática aguda. De acordo com as recomendações da *American Heart Association*, nessas situações deve-se selecionar uma droga de um outro grupo, como a clindamicina, azitromicina ou a claritromicina para a profilaxia da endocardite bacteriana (DAJANI *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 1998).

### *Lincosaminas*

A clindamicina é a única droga do grupo das lincosaminas que possui indicação na odontologia e constitui um dos antibióticos mais eficazes contra infecções odontogênicas sérias (MOENNING *et al.*, 1989; BAKER & FOTOS, 1994; GRAD 1997; ANDRADE, 1999).

Essa droga é ativa contra a maioria das bactérias Gram-positivas, abrangendo espécies anaeróbias e facultativas, inclusive o *Staphylococcus aureus* e outras espécies

produtoras de beta-lactamases. A clindamicina é particularmente ativa contra quase todos anaeróbios Gram-negativos, incluindo o *Bacteroides fragilis* (WALKER, 1992; MOENNIG *et al.*, 1989; SANDS *et al.*, 1995; ANDRADE, 1999). As bactérias Gram-negativas aeróbias não são sensíveis a clindamicina (WALKER, 1992; CHAMBERS & SANDE, 1995)

O grupo das lincosaminas atua na síntese protéica, dificultando a tradução da informação genética que permite essa síntese. Todas as reações químicas que ocorrem na célula são catalisadas por enzimas específicas. Essas enzimas são proteínas cuja estrutura é determinada pela informação contida no DNA do microrganismo, que vai ser convertida, através do processo de tradução genética, em uma proteína funcional. Esses antibióticos inibem a síntese protéica fixando-se a subunidade 50S dos ribossomos, impedindo a ligação do t-RNA (ácido ribonucléico-transportador). Essas drogas são bacteriostáticas, ou seja, impedem o crescimento e a reprodução bacteriana (WALKER, 1992; ANDRADE, 1999).

Devido ao seu uso estar associado a efeitos adversos sérios, como a colite pseudomembranosa (GILL & PALLASCH, 1981), a clindamicina deve ser reservada para as infecções odontogênicas graves, anaeróbias, que não responderam adequadamente aos antibióticos de primeira escolha, normalmente as penicilinas (WALKER, 1992; ANDRADE, 1999). Segundo MOENNIG *et al.* (1989) e BAKER & FOTOS (1994), devido ao fato da clindamicina ter seu uso limitado, essa droga continua efetiva contra a maioria dos microorganismos envolvidos nas infecções odontogênicas.

APPELBAUM *et al.* (1992), analisando a suscetibilidade de 540 bacilos Gram-negativos anaeróbios, relataram que a clindamicina foi ativa contra 98% das espécies testadas.

CULLMANN *et al.* (1993) investigando a suscetibilidade antimicrobiana de diversas bactérias anaeróbias a diferentes agentes, relataram que, dentre os antibióticos não beta-lactâmicos, a clindamicina foi o composto mais ativo. Essa droga também se mostrou

eficaz contra os *Bacteroides* spp., que foram consideradas, no estudo, as espécies mais resistentes aos agentes antibacterianos.

WEXLER *et al.* (1991) estudando *in vitro* a atividade da clindamicina, entre outros antibióticos, contra as bactérias anaeróbias, encontraram espécies de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* resistentes. APPELBAUM *et al.* (1992) alertaram que, nos Estados Unidos, a resistência à clindamicina está começando a surgir devido ao uso hospitalar generalizado desse composto.

FORBES *et al.* (1998) explicam que o mecanismo de resistência bacteriana a esse composto pode ser mediado por alteração genética no sítio de ligação da subunidade 50S dos ribossomos, fazendo com que a clindamicina não se ligue a eles, não inibindo assim, a síntese da proteína. Outro mecanismo de ação, citado pelos autores, é a diminuição da absorção da droga, que também pode ser auxiliado por um sistema de refluxo que certas bactérias possuem, no qual elas devolvem o antibiótico para fora da célula, diminuindo sua concentração intracelular e impedindo assim seu efeito.

WALKER (1992) e CHAMBERS & SANDE (1995) relatam que microrganismos resistentes à clindamicina freqüentemente apresentam resistência-cruzada com os macrolídeos. Entretanto as espécies resistentes à eritromicina não são necessariamente resistentes à clindamicina.

### *Macrolídeos*

Os macrolídeos são um grupo de antibióticos que possuem em comum, na sua estrutura química um anel lactônico de 15 átomos. Este grupo inclui a eritromicina e outras drogas relacionadas quimicamente com a eritromicina, como a claritromicina e roxitromicina (ANDRADE, 1999). A azitromicina difere dessas drogas pela a inserção de apenas um átomo de nitrogênio no anel lactônico de 15 átomos, o que parece conferir a essa droga mudanças em algumas características farmacocinéticas, como uma meia-vida

plasmática biológica bastante prolongada nos tecidos, e um maior espectro de ação (CHAMBERS & SANDE, 1995; ANDRADE, 1999).

Os macrolídeos são bacteriostáticos, e agem inibindo a síntese protéica bacteriana, através da ligação às subunidades 50S dos ribossomos (WALKER, 1992; ANDRADE, 1999).

A eritromicina apresenta espectro de ação similar ao das penicilinas G e V, com ação contra a maioria dos cocos Gram-positivos e a maioria das bactérias anaeróbias orais (MOENNING *et al.*, 1989; SANDS *et al.*, 1995). Porém, muitas bactérias anaeróbias e aeróbias têm desenvolvido resistência a essa droga (BAKER *et al.*, 1985; CULLMANN *et al.*, 1993).

A maioria das bactérias Gram-negativas apresenta resistência intrínseca a eritromicina devido à sua incapacidade de penetrar o complexo membrana externa e parede celular. A resistência adquirida pode ser mediada por plasmídeos que codificam uma alteração no sítio de ligação na subunidade 50S ou por enzimas que inativam a eritromicina (WALKER, 1992).

BAKER *et al.* (1985) isolaram 139 amostras bacterianas da cavidade oral, anaeróbias estritas e facultativas, e testaram a suscetibilidade bacteriana a diversos antibióticos. Os resultados demonstraram que praticamente todos os grupos bacterianos continham espécies resistentes à eritromicina, compreendendo espécies de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides oralis*, *Campylobacter* spp., *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*.

CULLMANN *et al.* (1993), em seu estudo da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias, relataram que a eritromicina não foi eficaz contra os patógenos anaeróbios Gram-negativos, não sendo eficaz contra *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium* spp.

Os autores mostraram que até mesmo algumas espécies Gram-positivas apresentavam resistência, entre elas *Peptostreptococcus* spp. e *Propionibacterium* spp.

HUNT *et al.* (1978) relataram que aproximadamente 50% das espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus* isoladas de infecções orais eram resistentes a eritromicina.

Segundo CHAMBERS & SANDE (1995), embora não sejam comuns a todas as localidades, as espécies de *Streptococcus* resistentes a eritromicina parecem estar aumentando, e freqüentemente também apresentam resistência a clindamicina.

A azitromicina devido a sua diferença estrutural, apresenta um espectro de ação aumentado quando comparado a eritromicina (CHAMBERS & SANDE, 1995; ANDRADE, 1999). Segundo FASS (1993), a azitromicina se apresenta mais ativa contra espécies Gram-negativas, como *Haemophilus influenzae* e *Fusobacterium* spp., e alguns bacilos Gram-negativos entéricos, o que presumivelmente se deve a uma melhor penetração da droga através da membrana externa e parede celular. Porém, segundo o autor, a azitromicina é menos ativa que a eritromicina contra os organismos Gram-positivos, especialmente *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. As duas drogas apresentam atividade equivalente contra *Staphylococcus* spp. e bactérias anaeróbias Gram-positivas. O autor verificou que embora a atividade antibacteriana dessas duas drogas variasse entre microrganismos, como regra geral, os microrganismos que eram relativamente suscetíveis a um eram suscetíveis ao outro, assim como microrganismos resistentes a um, também apresentavam resistência-cruzada ao outro; com exceção do *Fusobacterium*, que se mostrou suscetível somente a azitromicina.

PETERS *et al.* (1992), em uma revisão da literatura sobre a atividade antimicrobiana da azitromicina e de outros macrolídeos, relataram que embora a azitromicina apresentasse menor atividade do que a eritromicina *in vitro* contra os microrganismos Gram-positivos, clinicamente, as concentrações da azitromicina nos tecidos eram superiores as da eritromicina. Após a administração oral, as concentrações

sanguíneas da azitromicina são menores que a eritromicina, porém isso reflete a rápida movimentação da droga da circulação para os compartimentos intracelulares, resultando em uma maior concentração tissular do que a comumente vista com a eritromicina. Entretanto, a desvantagem potencial da baixa concentração sanguínea da azitromicina está relacionada a bacteremia que pode ocorrer em pacientes que estão comprometidos severamente. Contudo, a concentração tissular é mais importante que a sérica para o tratamento de doenças do trato respiratório e outras infecções (PETERS *et al.*, 1992).

Segundo ANDRADE (1999), ainda não existe um número suficiente de trabalhos na área odontológica, que permita avaliar a relação risco/benefício da azitromicina no tratamento das infecções odontológicas.

## **TESTES DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA**

Muitas bactérias, clinicamente importantes, são capazes de adquirir e expressar resistência a agentes antimicrobianos comumente usados para tratar infecções, o que torna necessário, em determinadas situações, a realização de testes laboratoriais para detectar a resistência ou suscetibilidade antimicrobiana desses microrganismos (FINEGOLD *et al.* 1988; CULLMAN *et al.* 1993; van STEENBERGEN *et al.* 1993; ROSENBLATT & BROOK 1993; WEXLER 1993; BARNARD *et al.* 1996; FORBES *et al.*, 1998).

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana estão indicados, de acordo com o *National Commitee for Clinical Laboratory Standards - NCCLS*, nas seguintes situações: determinação do padrão de suscetibilidade dos microrganismos a novos agentes antimicrobianos; monitoramento periódico dos padrões de suscetibilidade de bactérias dentro de uma área geográfica ou centro de saúde; auxílio ao tratamento de pacientes em casos de fracassos de terapêutica ou infecções persistentes, em casos da presença de uma espécie resistente aos agentes antimicrobianos comumente utilizados, na ausência de uma terapêutica comprovada para uma infecção em particular e da severidade da infecção (FINEGOLD *et al.*, 1988).

Testes de suscetibilidade geralmente consistem na avaliação da atividade direta do agente antimicrobiano sobre a bactéria, que são colocados juntos em um mesmo meio *in vitro* para verificar a viabilidade da bactéria na presença de um determinado medicamento em uma determinada concentração (FORBES *et al.*, 1998). Os métodos mais utilizados são os testes de suscetibilidade convencionais como a diluição em caldo (BARNARD *et al.*, 1996), a diluição em ágar (BAKER *et al.*, 1985; YAMAMOTO *et al.*, 1989) e o método da difusão de discos em ágar (ZELDOW & INGLE, 1962); e os testes de suscetibilidade comerciais, que são variações dos métodos convencionais de diluição (CULLMAN *et al.*, 1993) e difusão (CITRON *et al.*, 1991; NGUI-YEN *et al.*, 1992; OLSSON-LIJEQUEST, 1992; BROWN, 1992; BOLMSTRÖM, 1993; CONTI, 1997; LE GOFF *et al.*, 1997; VIGIL *et al.*, 1997).

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana são usados para determinar a concentração de um antibiótico necessária para inibir o crescimento do microrganismo *in vitro*. A menor concentração da droga capaz de inibir o microrganismo é denominada de concentração inibitória mínima (CIM) (WALKER, 1992).

Baseado nos critérios estabelecidos pelo NCCLS, quando a CIM do medicamento testado é determinada para uma bactéria em particular, esta pode ser classificada como suscetível, suscetibilidade intermediária ou resistente. Esses critérios de interpretação são resultados de estudos que correlacionam a CIM com o nível sérico atingido para cada agente antimicrobiano, mecanismos de resistência e sucesso da terapia. Portanto, se o microrganismo é inibido pela concentração do agente antimicrobiano que pode ser atingida no sangue ou tecidos do paciente que toma as doses recomendadas, o microrganismo é suscetível àquela medicação. Se a concentração do agente antimicrobiano requerida para inibição de um microrganismo é maior que a obtida no sangue e tecidos durante a terapia, o microrganismo é resistente. E se a concentração inibitória é igual ou ligeiramente maior do que aquela normalmente obtida no sangue, o microrganismo apresenta uma suscetibilidade intermediária à medicação (FORBES *et al.*, 1998).

Porém, segundo CHAMBERS & SANDE (1995), os testes de suscetibilidade antimicrobiana apresentam suas limitações, pois a concentração inibitória mínima (CIM) no plasma não reflete a concentração do antibiótico no sítio de infecção.

### *Métodos laboratoriais para se testar a suscetibilidade antimicrobiana*

#### *Método da diluição em caldo*

Segundo FORBES *et al.* (1998) no método da diluição em caldo, também denominado microdiluição ou macrodiluição, a bactéria e o agente antimicrobiano são colocados em um meio de cultura líquido. Cada agente antimicrobiano é testado usando uma série de concentrações, comumente expressas em µg da droga/mL do caldo; a menor concentração que inibe completamente o crescimento bacteriano é denominada concentração inibitória mínima (CIM). O exame do crescimento bacteriano é realizado através da análise da turbidez do meio.

Uma limitação desse método é que ele não fornece resultados acurados em bactérias de crescimento lento, pois períodos de incubação prolongados, superiores a 24 horas, podem permitir a deteriorização do agente antimicrobiano e resultar em um falso resultado de resistência (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993; FORBES *et al.*, 1998).

O teste de diluição em caldo pode se apresentar comercialmente como painéis para microdiluições já preparados com as diferentes concentrações dos antibióticos e formatados de acordo com as recomendações para o método convencional (BARNARD *et al.*, 1996, WEXLER, 1993; FORBES *et al.*, 1998).



### *Método da diluição em ágar*

O teste de diluição em ágar consiste no preparo de placas contendo meios a base de ágar com diferentes concentrações de um determinado agente antimicrobiano, nos quais serão posteriormente inoculadas bactérias. Após o período de incubação, as placas são examinadas quanto ao crescimento bacteriano, e a CIM é a menor concentração do agente antimicrobiano no agar que inibe completamente o crescimento visível de colônias bacterianas. Para cada diluição de um determinado antibiótico a ser estudada, será necessária uma placa, o que torna o método caro, trabalhoso e demorado, não representando o método de escolha de muitos laboratórios clínicos, que precisam testar muitos agentes antimicrobianos (FINEGOLD *et al.*, 1988; NGUI-YEN *et al.*, 1992; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993; FORBES *et al.*, 1998).

### *Método da difusão em ágar*

O método da difusão em ágar consiste no uso de discos de papel ou outros recipientes contendo uma determinada concentração do agente antimicrobiano, que são colocados na superfície de uma placa inoculada com a bactéria. O agente antimicrobiano difunde e forma um gradiente de concentração ao redor do disco e, após a incubação, o diâmetro da zona de inibição ao redor do disco é medido em milímetros e, obedecendo um critério de interpretação, classificado em suscetível, intermediário ou resistente. Esse método é prático e conveniente para testar várias substâncias contra uma bactéria (FORBES *et al.*, 1998).

Uma das principais desvantagens desse método é não determinar a CIM, impossibilitando conhecimentos mais precisos quanto ao grau de resistência ou suscetibilidade da bactéria. Esse também não é um método aceitável para o teste de microrganismos de crescimento lento (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993).

### *Epsilometer test (E-test)*

Um teste de suscetibilidade comercial, que representa uma variação do método de difusão em ágar, o E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia), foi desenvolvido combinando a conveniência e praticidade do método do disco com a habilidade de determinar a CIM (BOLMSTRÖM, 1993).

O E-test consiste em uma fita plástica de 50mm de comprimento e 3mm de largura, que contém em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita é colocada sobre uma placa de ágar, previamente inoculado com a bactéria a ser estudada, propiciando a difusão de um gradiente de antibiótico. Após o período de incubação, uma zona elíptica de inibição é formada; o ponto de interseção da borda da zona de inibição com a escala numérica da fita, referente à concentração da droga, representa a concentração inibitória mínima (CIM) (BOLMSTRÖM 1993)

O E-test constitui um método simples de realizar e fácil de interpretar para se testar a suscetibilidade antimicrobiana (CITRON *et al.*, 1991; NGUI-YEN *et al.*, 1992; OLSSON-LILJEQUEST, 1992; BROWN, 1992; BOLMSTRÖM, 1993; CONTI, 1997; LE GOFF *et al.*, 1997; VIGIL *et al.*, 1997). Para a maioria das combinações antibiótico-bactéria, a elipse formada é clara, com a CIM bem definida (CITRON *et al.*, 1991; BOLMSTRÖM, 1993)

OLSSON-LILJEQUIST (1992) comparou as CIMs determinadas pelo E-test com as CIMs obtidas pelo método de difusão em ágar de diversos antibióticos em grupos controles recomendados (American Type Culture Collection – ATCC) ou em grupos com CIMs já estabelecidas. Foram estudadas as seguintes espécies bacterianas: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Haemophilus influenzae*. Os resultados demonstraram uma excelente concordância entre as CIMs obtidas pelos dois métodos, com uma diferença não superior a  $\pm 1$  grau de diluição.

BROWN (1992) utilizou um grande número de espécies bacterianas isoladas clinicamente, em sua maioria anaeróbias facultativas, para correlacionar os resultados das CIMs de onze agentes antimicrobianos pelos métodos do E-test e da difusão em ágar. As CIMs dos dois testes apresentaram uma concordância de 87,9% ( $\pm 1$  grau de diluição). O autor concluiu que o E-test apresentou boa correlação com o método da diluição em agar para determinação das CIMs para as bactérias estudadas, e ressaltou a versatilidade e a facilidade do uso do E-test, características desejáveis para a rotina de um laboratório de microbiologia clínica.

NGUI-YEN et al. (1992) avaliaram a exatidão e a reprodutibilidade do E-test, comparando-o ao método da microdiluição. Para avaliar a exatidão do método, foram utilizadas 208 espécies bacterianas, incluindo os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, onde foi encontrada uma concordância entre as CIMs dos dois métodos. O E-test se mostrou um método confiável quanto à capacidade de reproduzir os resultados, quando se repetiu o teste por cinco dias sobre um grupo selecionado de bactérias, e os mesmos resultados foram obtidos, dentro de um intervalo de  $\pm 1$  diluição. Os autores concluíram que o E-test constitui um método simples, seguro e capaz de ser reproduzido para a determinação da CIM de organismos Gram-positivos.

O E-test é considerado um método eficaz para a determinação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (OLSSON-LILJEQUIST, 1992; BROWN, 1992; NGUI-YEN et al., 1992). Seu uso também é indicado para testar suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas (CITRON et al., 1991; NACHNANINI et al., 1992; BOLSMTRÖM, 1993; CONTI, 1997).

Os testes de suscetibilidade das bactérias anaeróbias são mais desafiantes do que os das aeróbias, em parte, devido ao crescimento lento de algumas espécies anaeróbias (FINEGOLD et al., 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993).

As bactérias anaeróbias são reconhecidamente patógenos significantes, não só nas infecções endodônticas (SUNDQVIST *et al.*, 1989; SUNDQVIST 1992a,b; BAUMGARTNER, 1991, 1996; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996a,b,c), como em outras infecções importantes em várias áreas do corpo (CULLMAN *et al.*, 1993; ROSENBLAT & BROOK, 1993). Há um problema evidente da crescente resistência dos anaeróbios aos agentes antimicrobianos, aumentando a demanda para o teste de suscetibilidade antimicrobiana; porém há uma discordância quanto aos métodos utilizados para determinar a suscetibilidade antimicrobiana desses microrganismos (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993, WEXLER, 1993).

Dentre os métodos disponíveis para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias, não há um consenso quanto ao teste que deveria servir como padrão, devido ao problema da falta de reprodutibilidade do teste e/ou à inabilidade de crescimento das bactérias anaeróbias estritas em determinados meios (ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993).

Os métodos estandardizados para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias preconizados pela NCCLS constituem o método da diluição em ágar e o método da microdiluição em caldo (FINEGOLD *et al.*, 1988; WEXLER, 1993). O método da diluição em ágar não é um teste prático para o uso de um laboratório clínico, devido ao seu custo elevado e tempo de trabalho. O método da microdiluição em caldo seria o mais conveniente, entretanto algumas bactérias anaeróbias não crescem suficientemente bem nesse sistema (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993).

O método da difusão de discos em ágar foi abolido pela NCCLS para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias. BOLMSTRÖM (1993) explica que os testes de difusão de discos geralmente não são aplicados para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias porque, em sua maioria, elas crescem lentamente e os discos podem formar um gradiente de antibiótico ao seu redor em um tempo inferior ao tempo necessário para o seu

início de crescimento. Uma zona larga de inibição pode simplesmente refletir um crescimento lento e não representar realmente a suscetibilidade. Testes baseados em um gradiente de antibiótico deve ser confiável somente se esse se manter estável por um período maior que o tempo crítico para o crescimento dos organismos testados.

O método do E-test tem sido avaliado para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas, e tem apresentado boa correlação com o método estandardizado da diluição em ágar (CITRON *et al.*, 1991; NACHNANINI *et al.*, 1992; BOLSMTRÖM, 1993; CONTI, 1997; ROTIMI *et al.*, 1999). Quando transferido para o ágar, o gradiente de antibiótico do E-test se mantém estável por no mínimo 12 horas, o que cobre o tempo crítico de iniciação do crescimento da maioria das bactérias anaeróbias (BOLMSTRÖM, 1993).

CITRON *et al* (1991) avaliou a correlação das CIMs determinadas pelos métodos do E-test e da diluição em ágar em 105 espécies bacterianas anaeróbias, isoladas clinicamente. Os resultados demonstraram uma concordância das CIMs dos dois métodos em 87% ( $\pm 1$  diluição) e em 98% ( $\pm 2$  diluições), após uma incubação de aproximadamente 20 horas (overnight). Após 48 hs, os resultados concordavam em 86% e 97% dos casos respectivamente. Os autores concluíram que as CIMs obtidas pelo E-test estavam de acordo com aquelas obtidas pelo método da diluição em ágar, na maioria dos casos, constituindo um método confiável para o teste de suscetibilidade tanto de bactérias anaeróbias de crescimento rápido, cujos resultados foram lidos “overnight”, quanto para aquelas de crescimento mais lento, que apresentaram bons resultados após 48 horas de incubação.

BOLMSTRÖM (1993), avaliando o E-test para o teste de suscetibilidade de bactérias anaeróbias, utilizou cepas controle (American Type Culture Collection – ATCC) de *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Clostridium perfringens* e *Eubacterium lentum*, e dezesseis antibióticos para comparar as CIMs com o uso do E-test e do método da diluição em ágar. Cerca de 90% dos valores das CIMs determinadas com o E-test e com a diluição em ágar estavam de acordo, com uma diferença de  $\pm 1$  diluição. A

reprodutibilidade dos resultados do E-test foi de 98% ( $\pm 1$  diluição), enquanto o método da diluição em ágar foi de 95% ( $\pm 1$  diluição). Os pontos de leitura das CIMs do E-test eram geralmente bem definidos e reproduzíveis. A autora focou nesse trabalho detalhes técnicos do método do E-test, comparando diferentes meios, diferentes inóculos, e tempo de leitura após 24 e 48 horas. Os meios testados foram: diferentes marcas de Wilkens-Chalgren Agar; Brucella Agar mais 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 1% de vitamina K e 0,5% de hemina; Schaedler Agar (Unipath) mais 5% de sangue; e meio para suscetibilidade antimicrobiana PDM (AB BIODISK) mais 5% de sangue. Duas concentrações de inóculo bacteriano, correspondente ao padrão McFarland 0.5 e 1, foram testadas em paralelo. Brucella Agar com sangue suplementado com vitamina K e hemina apresentaram um bom crescimento e forneceram os resultados das CIMs mais consistentes. A suspensão com padrão McFarland 1 para o E-test forneceu resultados mais próximos ao do procedimento estandardizado da diluição em ágar. As leituras realizadas com 24 e 48 horas foram equivalentes quando a densidade do inóculo estava correta.

LE GOFF *et al.* (1997) utilizaram o E-test para estudar a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de polpas necróticas e relataram que de 66 bactérias anaeróbias estritas estudadas, apenas 38 testes deram resultados confiáveis após a leitura no tempo máximo permitido de 48 horas, usando o meio Brucella Agar + 5% de sangue de carneiro desfibrinado + 1% de vitamina K + 0,5% de hemina, e uma suspensão bacteriana com padrão McFarland 1. Os testes foram lidos após 24 e 48h de incubação, sendo a segunda leitura idêntica à diluição mais próxima. Segundo os autores, embora os resultados do E-test fossem satisfatórios, a razão entre o número de espécies testadas e o número de resultados obtidos era insuficiente, o que confirmava que nenhum método é universalmente aplicável para as bactérias anaeróbias. Os autores explicaram que algumas bactérias requerem um período de incubação superior a 48h, tempo durante o qual as moléculas de antibióticos poderiam sofrer degradação, impedindo uma correta mensuração.

CONTI (1997) utilizou o E-test para testar a suscetibilidade antimicrobiana de 20 cepas de *Prevotella intermedia/Prevotella nigrescens* e 19 de *Porphyromonas gingivalis*

isoladas da região periodontal. Os testes foram realizados em duplicata, utilizando o meio Brucella Agar + 5% de sangue de carneiro desfibrinado + 1% de vitamina K + 0,5% de hemina e uma suspensão com padrão McFarland 1, e os resultados foram lidos após 48h. As CIMs foram estabelecidas para todas as espécies testadas e seu padrão de suscetibilidade determinado. A autora concluiu que o E-test mostrou-se um ensaio prático e sensível para determinar o padrão de suscetibilidade das cepas das bactérias anaeróbias fastidiosas estudadas, além de possuir a qualidade de reprodutibilidade.

ROTIMI *et al.* (1999), estudando a suscetibilidade de espécies bacterianas do gênero *Bacteroides* pelo método do E-test, aprovaram o método e detectaram a presença de espécies resistentes a diversos antibióticos. Os autores ressaltaram que, devido ao problema crescente da resistência bacteriana, os testes de suscetibilidade de bactérias anaeróbias se tornam obrigatórios para a conduta terapêutica de determinados pacientes, havendo então a necessidade de testes precisos, rápidos, e que suportem o crescimento adequado da maioria das bactérias clinicamente importantes.

## **SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS**

Se um microrganismo é clinicamente importante, é preciso conhecer quais as chances dele ser resistente aos agentes antimicrobianos comumente utilizados para erradicá-los, ou seja, as drogas de escolha. Segundo FORBES *et al.* (1998), a crescente disseminação de resistência entre as bactérias clinicamente importantes tem diminuído a lista de bactérias cuja suscetibilidade antimicrobiana possa ser predita com confiança baseada apenas na identificação, sem a necessidade de realizar testes. A resistência adquirida a vários agentes antimicrobianos explica a necessidade da realização de testes de suscetibilidade em todas as bactérias isoladas clinicamente significantes, incluindo diversos grupos, gêneros e espécies. Bactérias dos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* e *Acinetobacter*, comumente requerem testes de suscetibilidade antimicrobiana (FORBES *et al.*, 1998).

FINEGOLD *et al.* (1988), em uma revisão sobre os testes de suscetibilidade de bactérias anaeróbias, recomendou que organismos que são reconhecidos como virulentos e/ou comumente resistentes, como membros do grupo *Bacteroides fragilis*, “*Bacteroides* produtores de pigmento preto”, *Bacteroides gracilis*, certas espécies de *Fusobacterium* spp. e de *Clostridium* spp., deveriam ser considerados para teste.

ZELDOW & INGLE (1962), estudando a sensibilidade antimicrobiana de bactérias facultativas isoladas do canal radicular, testaram a suscetibilidade, através do método do disco, de espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, utilizando os seguintes antibióticos: penicilina, eritromicina, tetraciclina e clorafenicol. Os resultados demonstraram que 32,4% dos *Staphylococcus* eram resistentes à penicilina e 24,3% à tetraciclina. Em geral, os *Streptococcus* foram sensíveis aos antibióticos estudados, enquanto os *Enterococcus* foram resistentes à penicilina em 83% dos casos e à tetraciclina em 33%. Todos microrganismos estudados foram sensíveis à eritromicina e ao clorafenicol.

ENGSTRÖM (1964), testando a suscetibilidade de 68 amostras de *Enterococcus* isolados de infecções endodônticas, através do método do disco, verificou que esse microrganismo foi sensível à eritromicina, porém apresentou resistência à penicilina em 6% dos casos. Das amostras de *Enterococcus* que foram sensíveis à penicilina, poucas espécies eram eliminadas com dosagens normais, sendo necessárias alta dosagens do antibiótico para o tratamento de infecções generalizadas.

MIRANDA (1969) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de espécies resistentes ao preparo químico-mecânico durante o tratamento endodôntico, através do método do disco. Observou-se uma predominância de bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Enterococcus*. As bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* foram as mais resistentes, apresentando praticamente 90% das espécies resistentes à penicilina, enquanto os *Streptococcus* apresentavam 24%.



NORD & WADSTRÖM (1973) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de espécies de *Enterococcus* isoladas de pacientes com periodontites apicais e pulpites. As amostras foram identificadas como *Enterococcus faecalis*, e a suscetibilidade antimicrobiana dessas espécies foi testada através do método de diluição em ágar. A concentração inibitória mínima da ampicilina (0.5 – 2.0 µg/mL) foi menor que a da benzilpenicilina (1.0 – 4.0 µg/mL) e fenoximetilpenicilina (2.0 – 8.0 µg/mL) para todas as espécies testadas. A maioria das espécies testadas foram sensíveis à eritromicina, porém havia uma grande variação no grau de suscetibilidade das bactérias a essa droga (0.5 - >128 µg/mL), com o aparecimento de espécies resistentes. A concentração inibitória mínima de drogas do grupo das lincosaminas variava entre 8 e >128 µg/mL, sendo portanto, *Enterococcus* altamente resistentes às lincosaminas. Os autores concluíram que a ampicilina foi mais efetiva do que a penicilina contra o *Enterococcus faecalis*, e que a eritromicina e a lincosamina apresentavam um uso limitado devido à presença de espécies resistentes.

HEINTZ *et al.* (1975) estudaram, através do método do disco, a sensibilidade antimicrobiana de 50 espécies de *Enterococcus* spp. que persistiram no canal após preparo químico-mecânico e medicação intracanal. Todas as espécies testadas foram sensíveis à ampicilina e à vancomicina. Mais de 90% das espécies foram sensíveis à eritromicina. Todos os microrganismos foram parcialmente ou totalmente resistentes à penicilina e à clindamicina.

ERNEST *et al.* (1977) testaram o grau de sensibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas e facultativas isoladas dos canais radiculares de 55 dentes com polpas necrosadas. As bactérias anaeróbias estritas isoladas continham espécies pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*, e foram testadas quanto à suscetibilidade através de um método de diluição em caldo. As bactérias anaeróbias facultativas compreendiam espécies de *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e o teste utilizado foi o método do disco. Os autores demonstraram que, para as bactérias anaeróbias estritas

estudadas, a clindamicina foi a droga mais eficaz, mostrando-se ativa em 100% dos casos. A ampicilina e a penicilina G foram eficazes em 85% e 83%, respectivamente. A eritromicina foi a droga menos eficaz contra as bactérias anaeróbias estritas, apresentando-se eficaz em apenas 58% dos casos. As bactérias anaeróbias facultativas testadas apresentaram alta incidência de resistência: 58% das espécies facultativas eram resistentes à penicilina G e 81% à clindamicina. A ampicilina e a eritromicina foram eficazes, respectivamente, em 71% e 61% das bactérias facultativas estudadas. Os autores concluíram que a ampicilina era uma droga eficaz para o tratamento de infecções endodônticas, constituindo a droga de escolha. Entretanto, segundo os autores, se os resultados bacteriológicos indicassem uma infecção puramente anaeróbia, a droga preferida seria a clindamicina.

HUNT *et al.* (1978) analisaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de exsudatos de infecções odontogênicas agudas em 74 pacientes atendidos na Universidade de Emory, EUA, no período entre 1973 e 1976. Espécies de "*Streptococcus viridans*", *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e "*Bacteroides*" foram testadas através do método do disco, utilizando ampicilina, cefalotina, eritromicina e penicilina. Todas as espécies de *Streptococcus* isoladas foram suscetíveis à ampicilina, à cefalotina e à penicilina. Entretanto, aproximadamente 50% das espécies de "*Streptococcus viridans*" foram resistentes à eritromicina. Dentre as espécies de *Staphylococcus aureus* isoladas, 20% foram resistentes à ampicilina e à penicilina, e cerca de 50% foram resistentes à eritromicina.

Com o objetivo de estudar a evolução da microbiologia das infecções orais e sua suscetibilidade antimicrobiana, HUNT & MEYER (1983) estudaram 235 pacientes com infecções odontogênicas agudas, entre 1978 e 1981. Os autores encontraram, em contraste com seu estudo em 1978, que aproximadamente 15% das espécies de *Streptococcus viridans* isoladas se tornaram resistentes à penicilina. Segundo os autores, talvez o fato de

maior importância, foi o aparecimento de espécies de *Peptostreptococcus* (cerca de 15%) resistentes à ampicilina e à penicilina.

MATUSOW (1981) analisou a suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos isolados de 78 canais radiculares de dentes com abscessos dento-alveolares agudos. Do total de 105 microrganismos isolados, 82 eram aeróbios e anaeróbios facultativos, cuja sensibilidade antimicrobiana foi testada através do método do disco. Dentre essas bactérias, somando-se as espécies sensíveis e de sensibilidade intermediária aos antibióticos testados, 73 espécies se apresentaram suscetíveis à eritromicina; 72, à ampicilina; 67, à penicilina e 59, à clindamicina. A suscetibilidade das 23 bactérias anaeróbias isoladas também foi estudada através do método do disco, embora, segundo o autor, este método seja padronizado apenas para bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas. A clindamicina e a ampicilina foram efetivas contra todas as 23 espécies bacterianas anaeróbias estritas estudadas, seguidas da penicilina, que demonstrou eficácia contra 22 espécies. A eritromicina apresentou eficácia moderada, sendo ativa contra 19 espécies. Neste estudo, o gênero *Streptococcus* foi o mais predominante, e o *Enterococcus* o mais resistente. Dentre as espécies de *Enterococcus*, 59,7% foram resistentes à clindamicina, 21,5% resistentes à penicilina e à ampicilina, enquanto nenhuma resistência foi apresentada à eritromicina.

YAMAMOTO *et al.* (1989) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de espécies dos gêneros *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e *Bacteroides*, isoladas de canais radiculares de dentes com inflamações apicais agudas. Os resultados dos testes, utilizando o método da diluição em ágar, demonstraram que espécies de *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e “*Bacteroides* pigmentados de negro” foram sensíveis à benzilpenicilina e à amoxicilina. Os três grupos apresentaram certa resistência à eritromicina. Os *Bacteroides* não pigmentados se apresentaram mais resistentes quando comparados com os pigmentados, apresentando suscetibilidade intermediária à penicilina e muitas espécies resistentes à eritromicina. Os autores concluíram que as drogas do grupo das penicilinas foram mais efetivas contra as bactérias estudadas, o que as tornam as drogas de escolha para o tratamento de canais radiculares com periodontites apicais agudas.

STERN *et al.* (1990) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas após o preparo químico-mecânico de canais radiculares. Os autores revelaram que a maioria das culturas positivas era representada por monoinfecções (92,19%), e as espécies mais frequentemente isoladas pertenciam ao gênero *Streptococcus*, principalmente espécies de “*Streptococcus viridans*” ( $\alpha$ -hemolíticos) e *Streptococcus* do grupo D de Lancefield (*Enterococcus*). A suscetibilidade antimicrobiana dessas espécies foi testada utilizando o método do disco. Das espécies de “*Streptococcus viridans*” ( $\alpha$ -hemolíticos) estudadas, 97,9% foram sensíveis à ampicilina, 93,7% à penicilina e 85% à eritromicina. Entre as espécies de *Enterococcus*, 92,8% foram sensíveis à ampicilina, 36,1% à penicilina e 61,9% à eritromicina. O estudo foi realizado entre o ano de 1981 e 1987, e os autores relataram que não houve uma mudança significativa no padrão de suscetibilidade das bactérias no período estudado.

BARNARD *et al.* (1996) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de uma cepa de *Actinomyces israelii* isolada de uma lesão periapical persistente ao tratamento endodôntico, através do método da diluição em caldo. Os autores relataram que o crescimento bacteriano foi inibido por baixas concentrações dos antibióticos testados: ampicilina, amoxicilina, cefalexina, eritromicina, clindamicina e tetraciclina.

LE GOFF *et al.* (1997) avaliaram a microbiota do canal radicular e sua suscetibilidade antimicrobiana em 26 dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais crônicas. Foram isoladas 84 espécies bacterianas, em sua maioria anaeróbias estritas, representadas principalmente por espécies de *Bacteroides gracilis*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella buccae* e *Eubacterium lentum*. O teste de suscetibilidade foi realizado através do E-test, e o resultado de 38 cepas estudadas demonstrou que as bactérias anaeróbias estritas isoladas das infecções endodônticas foram altamente sensíveis à amoxicilina e à amoxicilina associada ao ácido clavulânico, não apresentando resistência por produção de beta-lactamases.

VIGIL *et al.* (1997) estudaram o padrão de suscetibilidade de microrganismos isolados de 28 lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico. Os microrganismos mais comumente isolados foram: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, “*Wolinella recta*”, *Fusobacterium* spp. e *Clostridium* spp. Os autores utilizaram o E-test para avaliar a suscetibilidade dessas bactérias e concluíram que os resultados encontrados não deixaram evidências claras de resistência antibiótica significativa entre as cepas testadas.

### 3. PROPOSIÇÃO

1. Estudar a composição da microbiota dos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com imagens radiográficas sugestivas de lesões periapicais persistentes com necessidade de retratamento endodôntico
2. Analisar a sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Enterococcus faecalis* e *Peptostreptococcus* spp. isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1- Coleta, isolamento, purificação e identificação das bactérias dos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente.

#### 4.1.1 *Pacientes*

##### 4.1.1.1 Seleção dos pacientes

Foram selecionados pacientes que apresentavam dentes com necessidade de retratamento endodôntico. O insucesso do tratamento endodôntico foi evidenciado pela constatação de uma área radiolúcida na região periapical do dente envolvido, acompanhada ou não de sinais e sintomas, indicando a persistência da lesão por um período mínimo de 2 anos após o tratamento endodôntico. Os pacientes com necessidade de retratamento por indicação protética, ou seja, os casos nos quais a obturação endodôntica não estava satisfatória, porém não apresentava presença de lesão periapical visível na radiografia, não foram incluídos na pesquisa.

Foram obtidos os dados relativos ao sexo, idade, doenças sistêmicas e uso de medicamentos. Os pacientes com doenças sistêmicas e com história de antibioticoterapia inferior a 6 meses não foram incluídos no estudo.

Foi estudado um total de 30 dentes. Os pacientes assinaram um termo de consentimento elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (Anexo I).

##### 4.1.1.2 Aspectos clínicos e radiográficos

Para cada paciente foram anotados dados pessoais, história médica e história dentária. No exame subjetivo foram anotados dados sobre a condição atual do dente a ser

retratado, quanto à presença ou ausência de dor. No exame objetivo foram anotados dados tais como a presença de edema, de fistulas, presença ou não de restaurações do dente tratado endodonticamente, cáries e fraturas. Foram realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal.

Na análise radiográfica, foram avaliados os limites das obturações prévias dos canais radiculares, que foram divididos nos seguintes intervalos: 0-2 mm do ápice, 3-5 mm, >5mm do ápice; e a qualidade da obturação, que foi classificada em boa, quando radiograficamente não se observava áreas radiolúcidas na obturação ou entre o material obturador e a parede do canal, e em ruim, quando havia a presença de falhas radiolúcidas na obturação, indicando um selamento deficiente. A lesão periapical visível radiograficamente relacionada ao dente tratado endodonticamente estava presente em todos os casos indicados para retratamento.

#### 4.1.2. Coleta de amostras

O método utilizado neste estudo já foi descrito previamente em detalhe por GOMES (1995) e GOMES *et al.* (1994; 1996a,b,c).

Os seguintes princípios foram observados ao coletar as amostras dos canais radiculares:

1. Técnicas assépticas foram usadas durante a terapia endodôntica e coleta de amostra.
2. Anestesia local.
3. Remoção dos contaminantes coronários.
4. Restauração de todas as vias de contaminação externa.
5. Isolamento absoluto do dente.
6. Descontaminação do campo operatório.
7. Evitar contaminação química do espaço pulpar.
8. Assegurar um acesso fácil ao instrumento de amostra.



## 9. Coletar amostras eficientemente e efetivamente.

Após a colocação do isolamento absoluto, a descontaminação do campo operatório (dente, grampo, lençol de borracha e arco) foi feita com a solução de hipoclorito de sódio a 1%. Para evitar a contaminação química do canal radicular com essa solução, realizou-se a neutralização do hipoclorito com o tiosulfato de sódio a 5% (MÖLLER, 1966). A seguir, realizou-se a abertura coronária, e, em cada caso, foi coletada amostra de um único canal radicular, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico. Assim, em casos de dentes multirradiculares, o primeiro critério era a presença de lesão periapical associada ao canal a ser coletado, em caso de presença de lesão periapical em todas as raízes, escolhia-se o canal mais amplo.

Antes da coleta de amostras, foi executada a remoção do material obturador com brocas de Gates Glidden e limas endodônticas, sem o uso de solventes da guta-percha. Foi realizada uma tomada radiográfica para obtenção do comprimento de trabalho (1,0 mm do ápice radiográfico) e para verificar a remoção do material obturador. A seguir, realizou-se uma irrigação do canal radicular com solução salina para remover qualquer resíduo do material obturador, e deixar o canal úmido para a coleta.

Para a coleta de amostra bacteriológica, cones de papel absorvente autoclavados foram introduzidos no comprimento de trabalho pré-estabelecido permanecendo nesta posição por 60 segundos (Fig. 4.1A). O papel absorvente, ao ser retirado do canal, foi imediatamente introduzido em tubo de Eppendorf contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar (MÖLLER 1966, DAHLÉN *et al.* 1993) (Fig. 4.1B), o qual foi transportado para o laboratório de Microbiologia. A coleta das amostras dos canais radiculares foi realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio (BERG & NORD, 1973).

#### 4.1.3. Inoculação e Incubação

No laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP, dentro da cabine de anaerobiose (DON WHITLEY SCIENTIFIC, Bradford, Inglaterra) (Anexo IV), o tubo de Eppendorf contendo VMGA III e o cone de papel absorvente foi agitado (Agitador MA 162-MARCONI, São Paulo, SP, Brasil) por 60 segundos. A seguir, foram realizadas diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000 utilizando “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB - Lab M, Bury, Inglaterra) (Fig. 4.1C e 4.1D), e foram inoculados 50 µL de cada diluição em placas pré-reduzidas contendo “Fastidious Anaerobe Agar” (FAA - Lab M, Bury, Inglaterra) + 5% de sangue de carneiro e FAA + 5% de sangue de carneiro + suplementos seletivos para anaeróbios (Fig. 4.1E), as quais foram incubadas em uma câmara de anaerobiose (Fig. 4.1F), a 37°C numa atmosfera de 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub> até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento mais lento.

As amostras do canal radicular foram inoculadas e incubadas como a seguir:

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA (Fastidious Anaerobe Agar), 37° C, aerobicamente, por 2 dias (anaeróbios facultativos e aeróbios)
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA, 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + ácido nalidíxico (NAL) (Lab M, Bury, UK), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-positivos e actinomicetos.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL + vancomicina (VAN) (Lab M, Bury, UK), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + neomicina (NEO) (Lab M, Bury, UK), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar clostrídios e outros anaeróbios.

O presente estudo utilizou meios de cultura na forma de pó desidratado e suplementos seletivos pré-fabricados, que foram preparados de acordo com as orientações do fabricante (Anexo II). Os meios de transporte foram preparados de acordo com a fórmula descrita por DAHLÉN *et al.* 1993 (Anexo III).

#### 4.1.4 Isolamento e identificação microbiana

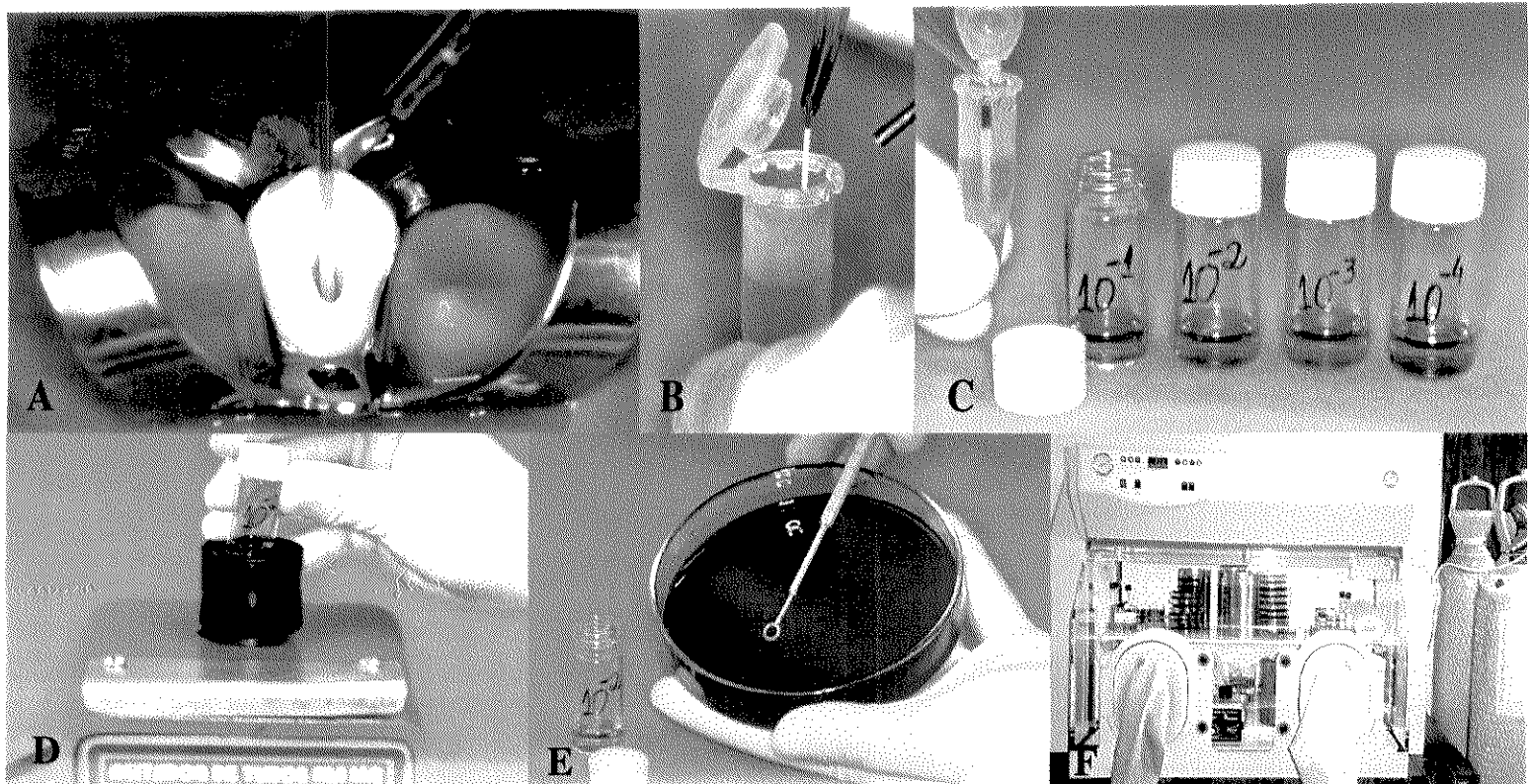
As placas com crescimento bacteriano foram examinadas em lupa estereoscópica (LAMBDA LET 2, ATTO INSTRUMENTS CO., Hong Kong) em aumento de 3 vezes, e as colônias foram diferenciadas de acordo com as suas características macroscópicas na placa (Fig. 4.2A), observando tamanho, cor, forma, textura, elevação, opacidade e hemólise. As colônias bacterianas foram isoladas em 2 placas contendo 5% de sangue de carneiro + FAA, e testadas quanto ao seu requerimento gasoso, colocando uma placa na estufa de O<sub>2</sub> e uma na câmara de anaerobiose, e observando em qual condição gasosa houve o crescimento bacteriano. As culturas puras (Fig. 4.2B), após serem testadas quanto ao requerimento gasoso (Fig. 4.2C), foram coradas pelo método do Gram (Fig. 4.2D) e testadas quanto à produção de catalase (Fig. 4.2E). Os seguintes métodos de identificação padronizados (Anexo V) foram utilizados para a especificação primária dos organismos isolados:

- Rapid ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os bastonetes Gram-negativos e Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios.
- RapID ANA II System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., EUA) para os cocos Gram-positivos e bacilos Gram-negativos e Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios
- API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estafilococos e micrococos (cocos Gram-positivos, catalase positiva)
- API 20 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa) (Fig 4.2 F e 4.2G)

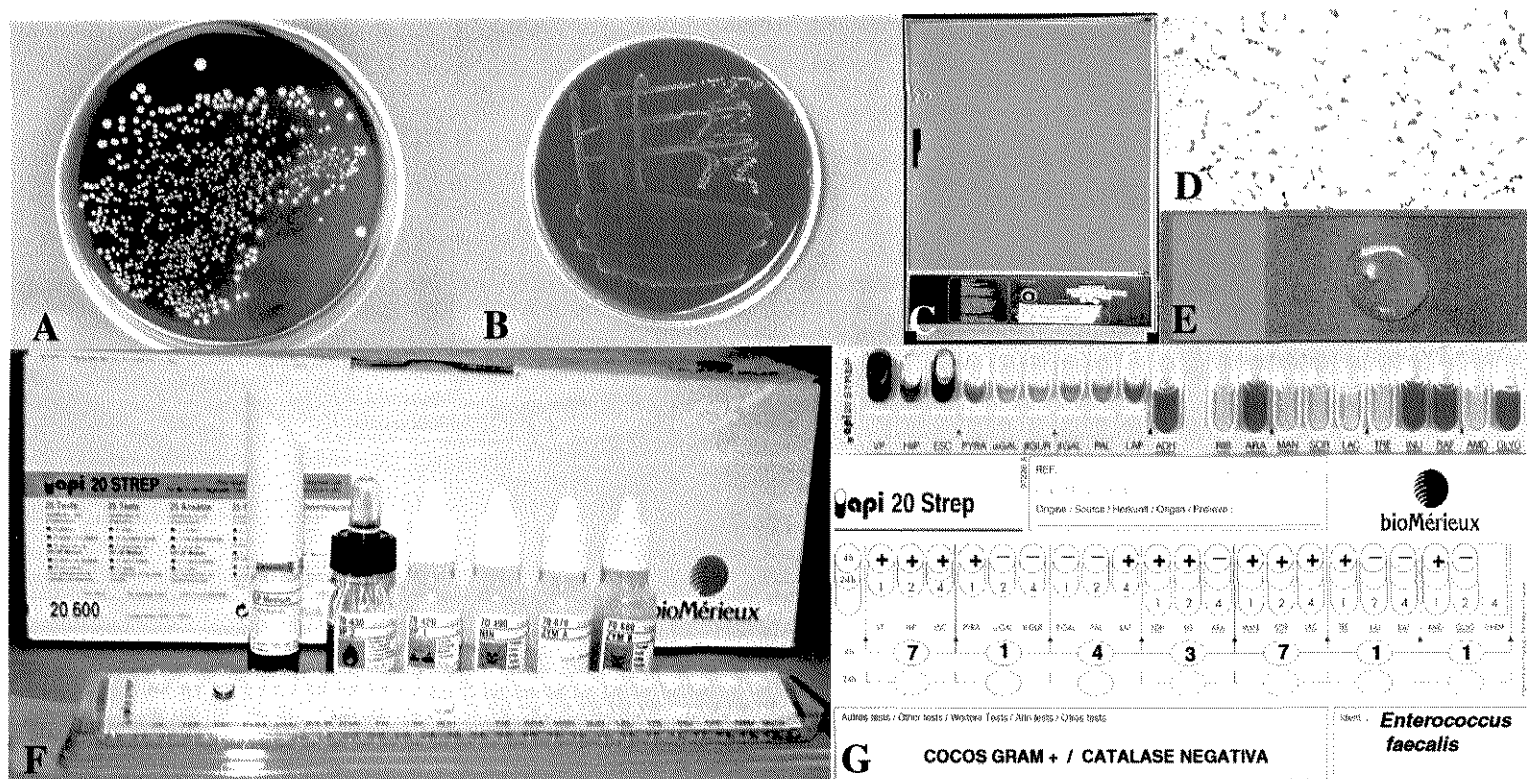
- Rapid ID 32 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa)
- RapID NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., EUA) para *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Actinobacillus*

#### 4.1.5 Análise estatística

Os dados coletados, referentes aos aspectos clínicos e radiográficos e às espécies bacterianas isoladas dos dentes estudados, foram introduzidos numa planilha de cálculo (QUATTRO PRO, Bordland International Inc., Scotts Valley, CA, EUA) e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). O teste de “Pearson Chi-square”, ou “Fisher’s Exact Test” quando apropriado, foram utilizados para testar a hipótese nula de que não existe relação entre os aspectos clínicos e radiográficos dos dentes com tratamento endodôntico prévio e a presença de espécies bacterianas específicas.



**Figura 4.1.** A- Coleta do canal radicular, B- Meio de transporte VMGA III, C- Diluição, D- Agitador de tubos, E- Inoculação, F- Incubação na câmara de anaerobiose.



**Figura 4.2.** A- Primeira cultura (monoinfecção), B- Cultura pura, C- Requerimento gasoso, D- Morfologia microscópica, E- Teste da catalase, F- Kit de identificação api 20 Strep, G- Especificação bacteriana.

#### **4.2- Teste de suscetibilidade antimicrobiana das espécies bacterianas dos gêneros *Enterococcus* e *Peptostreptococcus* isoladas dos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente.**

Dez cepas de *Enterococcus faecalis*, cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, e 6 cepas de *Peptostreptococcus* spp., cocos Gram-positivos anaeróbios estritos, foram testadas quanto sua suscetibilidade/resistência através do método do E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia). Os agentes antimicrobianos testados foram: benzilpenicilina (PG), amoxicilina (AC), amoxicilina + ácido clavulânico (XL), clindamicina (CM), eritromicina (EM) e azitromicina (AZ).

O sistema do E-test consiste em uma fita plástica de 50mm de comprimento e 3mm de largura, que contém em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita do E-test pode detectar uma CIM que varia de 0,016 a 256 µg/mL, com um total de 29 diferentes concentrações, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (BOLMSTRÖM 1993) (Fig. 4.3).

Para preparar o inóculo, após 24-48 h de incubação da espécie bacteriana em placas de ágar sangue (Fig. 4.4A), as colônias bacterianas foram transferidas para o meio líquido “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB) e agitadas (Fig. 4.4B e 4.4C), para atingir a turbidez que equivale ao padrão 0,5 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil) para bactérias anaeróbias facultativas, ou padrão 1 para bactérias anaeróbias estritas, que foi verificado no espectrofotômetro (FEMTO 432, MARCONI, São Paulo, SP, Brasil) (Fig. 4.4D) com comprimento de onda de 800 nm.

Placas contendo 4 mm de espessura de Brucella Agar (OXOID, Hampshire, Inglaterra) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 1% de vitamina K + 0,5% de hemina (para bactérias anaeróbias estritas) ou Mueller-Hinton ágar (OXOID, Hampshire, Inglaterra) (para bactérias anaeróbias facultativas), foram utilizadas para o repique das cepas. A

semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, uniformemente, através de swab estéril, umedecido na suspensão bacteriana (Fig. 4.4E). Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test (Fig. 4.4F), que haviam sido previamente removidas do congelador e já se encontravam a temperatura ambiente cerca de 20 minutos, foram distribuídas nas placas (Fig. 4.4G) com o auxílio de pinça estéril para cada substância a ser testada. O experimento foi executado em duplicata e sempre em fluxo laminar.

As placas contendo *Peptostreptococcus* spp. foram imediatamente incubadas em uma câmara de anaerobiose, a 37°C numa atmosfera de 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub> (Fig. 4.4H) e a leitura do halo foi realizada após 24-48 h de incubação (Fig. 4.4G). As placas contendo *Enterococcus faecalis* foram incubadas em condições aeróbicas, e a leitura realizada após 16-20 horas. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test, considerando o ponto de inibição completa de crescimento (Fig. 4.5A e 4.5B).

De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada seguindo o guia de interpretação da NCCLS. As espécies de *Enterococcus* foram testadas com os seguintes antibióticos: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina e azitromicina. Segundo o *National Commitee for Clinical Laboratory Standards*, a clindamicina não é clinicamente efetiva contra *Enterococcus* spp., logo testes com esse antibiótico não são recomendados, pois mesmo que a clindamicina apareça efetiva *in vitro*, os isolados não devem ser reportados como suscetíveis. Para se determinar o perfil de suscetibilidade de espécies de *Enterococcus* spp. foi utilizado o guia de interpretação da NCCLS-M100 S10 (Tabela 4.1).

As espécies de *Peptostreptococcus* spp. foram testadas com a benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, e clindamicina. A resistência das espécies de *Peptostreptococcus* spp. a eritromicina e a azitromicina não pôde ser confiantemente determinada com o E-test porque as CIMs desses antibióticos para as bactérias anaeróbias



estritas não foram ainda determinadas (NCCLS-M100 S8/M11 A4; VIGIL *et al.*, 1997). O documento da NCCLS-M100 S8/M11 A4 fornece dados sobre as CIMs de diversos antibióticos e os valores interpretativos para as bactérias anaeróbias estritas (Tabela 4.2).

**Tabela 4.1** – Valores interpretativos das concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobianos avaliados nos testes de *Enterococcus* spp. (NCCLS- M100 S10)

Agentes antimicrobianos	Suscetível	Intermediário	Resistente
Benzilpenicilina	$\leq 8$	-	$\geq 16$
Amoxicilina	$\leq 8$	-	$\geq 16$
Amoxicilina + ácido clavulânico	$\leq 8$	-	$\geq 16$
Eritromicina	$\leq 0,5$	1-4	$\geq 8$
Azitromicina	$\leq 2$	4	$\geq 8$

**Tabela 4.2** – Valores interpretativos das concentrações inibitórias mínimas ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antimicrobianos avaliados nos testes de bactérias anaeróbias estritas (NCCLS-M100 S8/M11A4)

Agentes antimicrobianos	Suscetível	Intermediário	Resistente
Benzilpenicilina	$\leq 0,5$	1	$\geq 2$
Amoxicilina	$\leq 0,5$	1	$\geq 2$
Amoxicilina + ácido clavulânico	$\leq 4$	8	$\geq 16$
Clindamicina	$\leq 2$	4	$\geq 8$

**E**  
CM

256  
192  
128  
96  
64  
48  
32  
24  
16  
12  
8  
6  
4  
3  
2  
1.5  
1.0  
.75  
.50  
.38  
.25  
.19  
.125  
.094  
.064  
.047  
.032  
.023  
.016

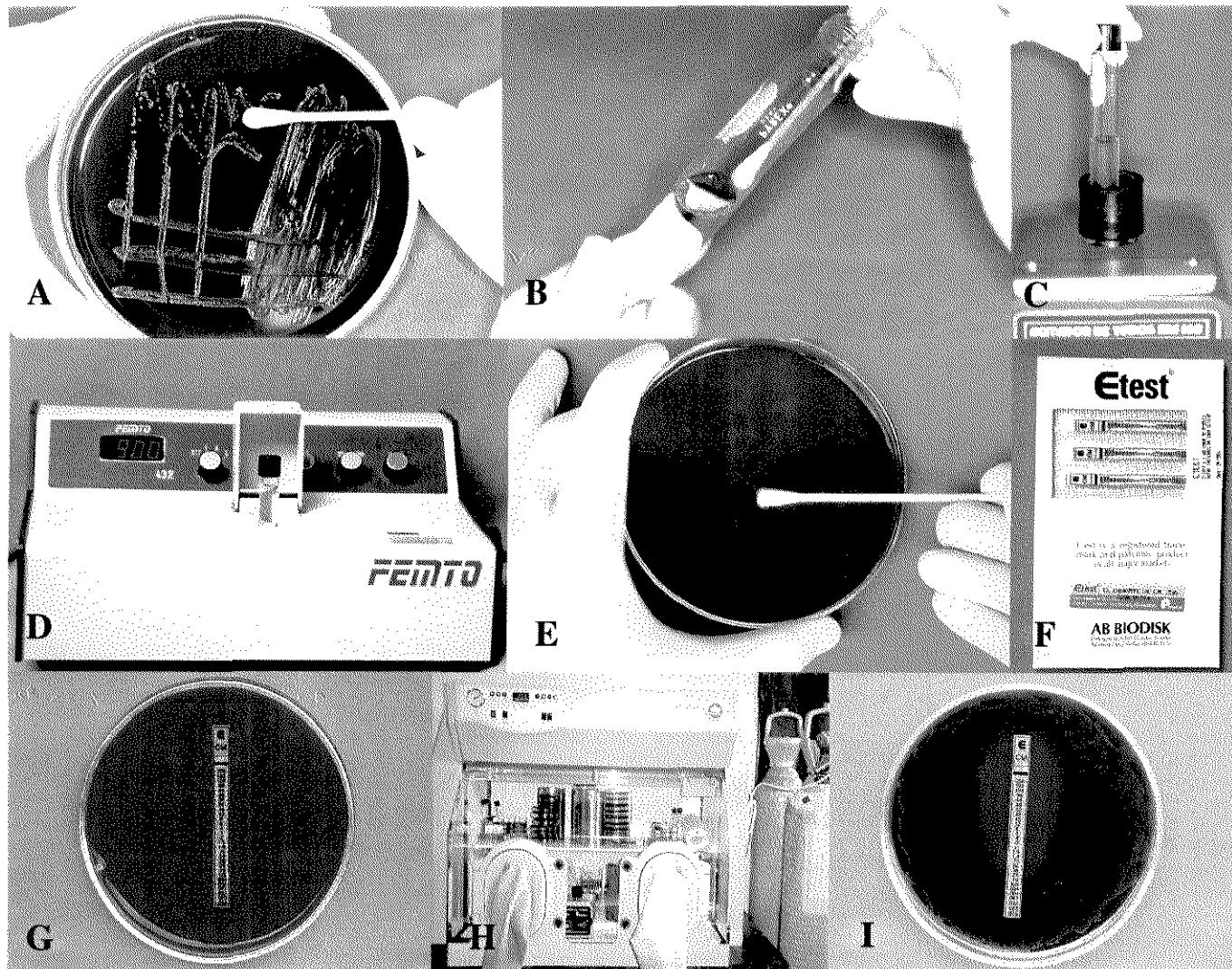
**Etest<sup>®</sup>**

Etest is a registered trademark and patented product in all major markets.

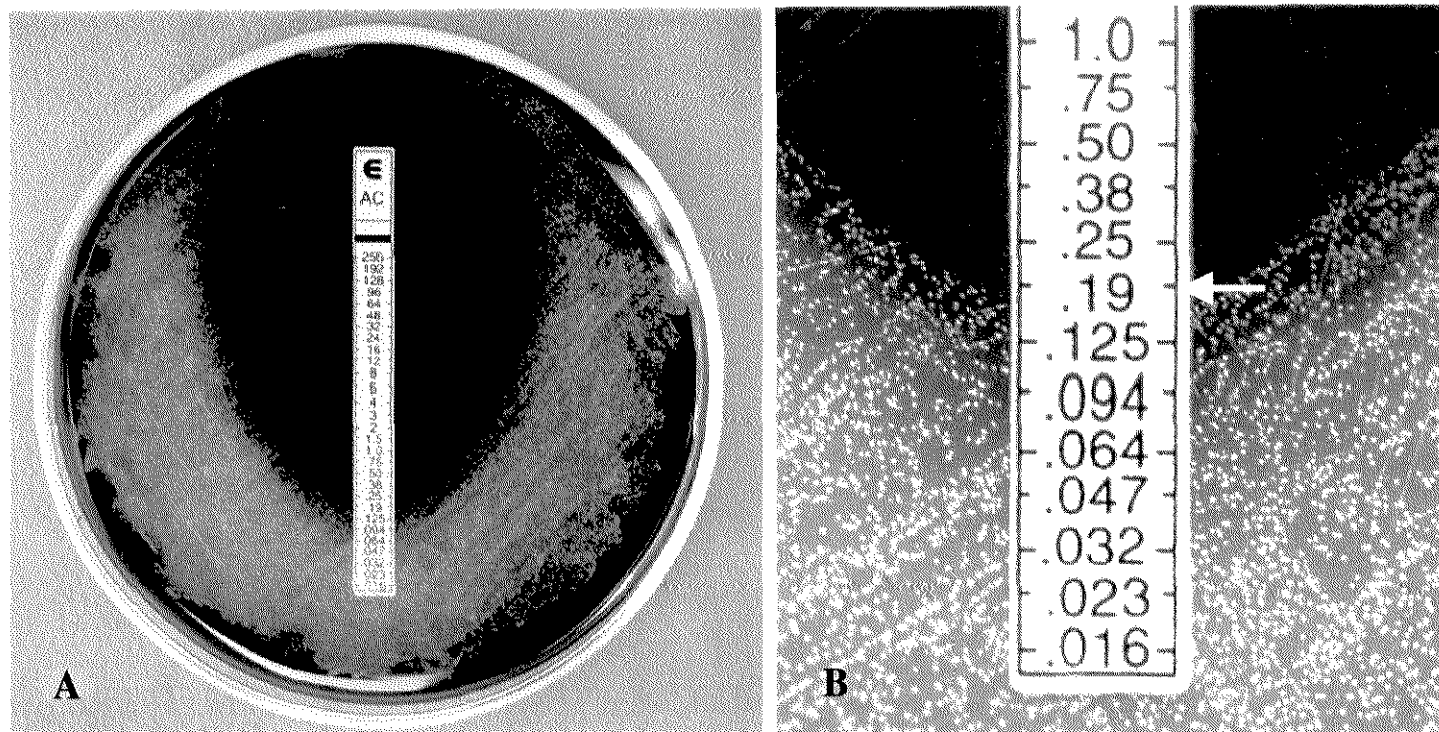
**AB BIODISK**  
Etestgruppen AB, S-161 86 Solna, Sweden  
Tel: +46 (0) 770 07 60 Fax: +46 (0) 83 31 36

**Etest**  
Etest är ett varumärke och patenterat produkt i alla stora marknader.  
1995-05-20

Figura 4.3. E-test



**Figura 4.4.** A- Cultura pura, B- Preparo do inóculo bacteriano, C- Agitação do inóculo, D- Verificação da turbidez do meio no espectrofotômetro, E- Inoculação, F- E-test, G- Fita do E-test na placa, H- Incubação, I- Halo de inibição em forma de elipse.



**Figura 4.5.** A- Halo de inibição em forma de elipse, B- Verificação da CIM

## 5. RESULTADOS

As características clínicas e radiográficas dos 30 dentes estudados são apresentadas nas Tabelas 5.1 e 5.2. Dos 30 casos estudados, 6 (20%) canais não apresentaram crescimento bacteriano, 13 (43,3%) canais abrigavam apenas 1 bactéria por canal radicular, 2 (6,7%) apresentavam 2 bactérias, e 9 (30%) apresentavam 3 ou mais microrganismos por canal radicular (Fig. 5.1).

Foi isolado um total de 56 microrganismos, compreendendo 55 bactérias e 1 fungo. As espécies microbianas isoladas e sua prevalência nos canais radiculares são mostradas na Tabela 5.3. A espécie bacteriana mais comumente isolada foi o *Enterococcus faecalis*, presentes em 11 (45,8%) dos 24 casos que apresentaram crescimento bacteriano. As características clínicas e radiográficas, e os microrganismos presentes em cada caso são mostrados no Anexo VI.

Bactérias anaeróbias facultativas estavam presentes em 63,3% dos casos estudados, representando 58% do total de bactérias isoladas. Bactérias anaeróbias estrictas estavam presentes em 40% dos canais, correspondendo a 42% do total de espécies isoladas. Os canais radiculares apresentavam uma microbiota predominantemente Gram-positiva, representando 80% do total de bactérias isoladas (Fig. 5.2).

A análise estatística dos dados não demonstrou associação entre as características clínicas dos dentes estudados, como a presença ou ausência de restauração ou dor, com nenhuma espécie bacteriana específica, nem com o número de espécies bacterianas por canal radicular. Quanto às características radiográficas, embora o limite e a qualidade da obturação endodôntica não tenham mostrado associação com espécies bacterianas específicas, apresentaram-se associados com o número de espécies por canal radicular. Os resultados estatísticos revelaram correlação entre obturações de má qualidade e a presença de três ou mais espécies bacterianas no canal radicular ( $p < 0.05$ ).

Os gêneros bacterianos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares foram *Enterococcus* (36,7%), *Streptococcus* (33,3%), *Peptostreptococcus* (23,3%), *Actinomyces* (13,3%), *Prevotella* (10%), *Staphylococcus* (10%), *Gemella* (10%), *Fusobacterium* (6,7%), *Veillonella* (6,7%), *Lactobacillus* (6,7%), *Propionibacterium* (3,3%) e *Haemophilus* (3,3%) (Fig. 5.3).

Dez cepas de *Enterococcus faecalis*, que foram as espécies anaeróbias facultativas mais freqüentes, e 6 cepas de *Peptostreptococcus* spp., bactérias anaeróbias estritas mais isoladas, foram testadas quanto a suscetibilidade antimicrobiana. Nas Tabelas 5.4 e 5.5 podem ser observados os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antibióticos e os valores interpretativos da suscetibilidade das espécies de *Enterococcus* testadas. Todas as espécies de *Enterococcus faecalis* foram sensíveis à benzilpenicilina, à amoxicilina e à amoxicilina + ácido clavulânico, com estes últimos apresentando CIMs menores quando comparados à benzilpenicilina. Entretanto, dos 10 *Enterococcus faecalis* estudados, apenas 1 (10%) foi sensível à eritromicina, 7 (70%) apresentaram suscetibilidade intermediária, e 2 (20%) foram resistentes. Quando testados com a azitromicina, houve um aumento dos valores das CIMs, e a resistência foi verificada em 60% dos casos, e 40% apresentaram um padrão de suscetibilidade intermediário.

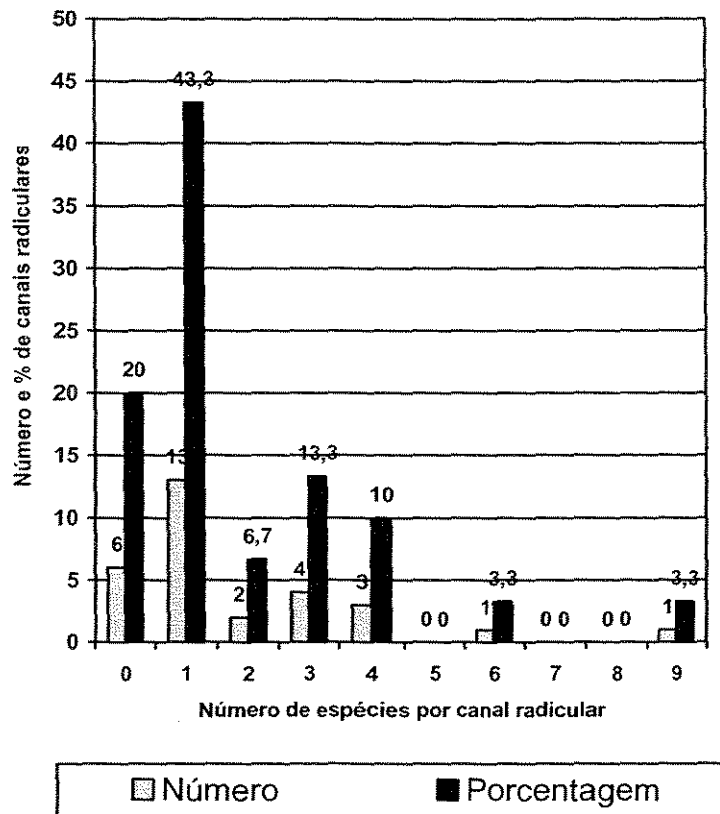
Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antibióticos e os valores interpretativos da suscetibilidade das espécies de *Peptostreptococcus* podem ser verificados nas Tabelas 5.6 e 5.7. As espécies estudadas se mostraram altamente sensíveis à benzilpenicilina, à amoxicilina, à amoxicilina + ácido clavulânico e à clindamicina.

**Tabela 5.1.** Características clínicas de 30 dentes com insucesso endodôntico

	Número	Porcentagem
Dentes		
11, 21	5	16,7%
12, 22	11	36,7%
13, 23	1	3,3%
14	1	3,3%
15	2	6,7%
31, 41	2	6,7%
32, 42	2	6,7%
37	1	3,3%
44	1	3,3%
45	2	6,7%
46	2	6,7%
Restauração		
Rest. Definitiva	19	63,3%
Rest. Provisória	6	20%
Não restaurado	5	16,7%
Dor		
Dor presente	5	16,7%
Assintomático	25	83,3%

**Tabela 5.2.** Características radiográficas de 30 dentes com insucesso endodôntico

	Número	Porcentagem
Limite da obturação		
0-2 mm do ápice	17	56,7%
3-5 mm do ápice	11	36,7%
>5 mm do ápice	2	6,7%
Qualidade radiográfica da obturação		
Boa	14	46,7%
Ruim	16	53,3%



**Figura 5.1.** Distribuição de espécies microbianas em 30 canais de dentes com insucesso endodôntico.



**Tabela 5.3.** Microrganismos isolados de 30 canais de dentes com insucesso endodôntico

Espécies microbianas	Nº de canais	% de canais
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	36,7
<i>Streptococcus sanguis</i>	3	10
<i>Streptococcus mitis</i>	2	6,7
<i>Streptococcus constellatus</i>	2	6,7
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	3,3
<i>Streptococcus mutans</i>	1	3,3
<i>Streptococcus oralis</i>	1	3,3
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	3,3
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	5	16,7
<i>Peptostreptococcus micros</i>	2	6,7
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1	3,3
<i>Peptostreptococcus saccharolyticus</i>	1	3,3
<i>Prevotella buccae</i>	2	6,7
<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	1	3,3
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1	3,3
<i>Prevotella corporis</i>	1	3,3
<i>Prevotella loescheii</i>	1	3,3
<i>Actinomyces naeslundii</i>	2	6,7
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	1	3,3
<i>Actinomyces viscosus</i>	1	3,3
<i>Propionibacterium acnes</i>	1	3,3
<i>Gemella morbillorum</i>	3	10
<i>Staphylococcus lentus</i>	2	6,7
<i>Staphylococcus aureus</i>	1	3,3
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	2	6,7
<i>Veillonella spp.</i>	2	6,7
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	6,7
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	1	3,3
<i>Candida spp.</i>	1	3,3

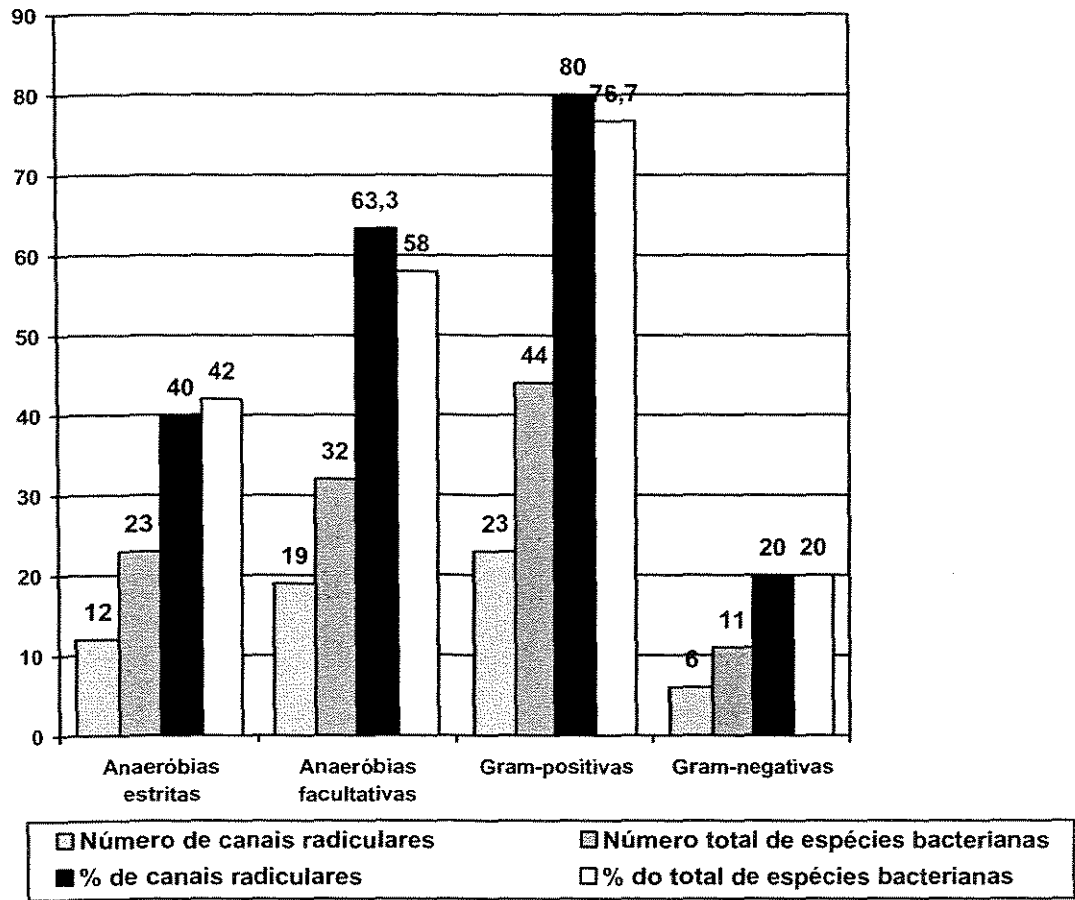
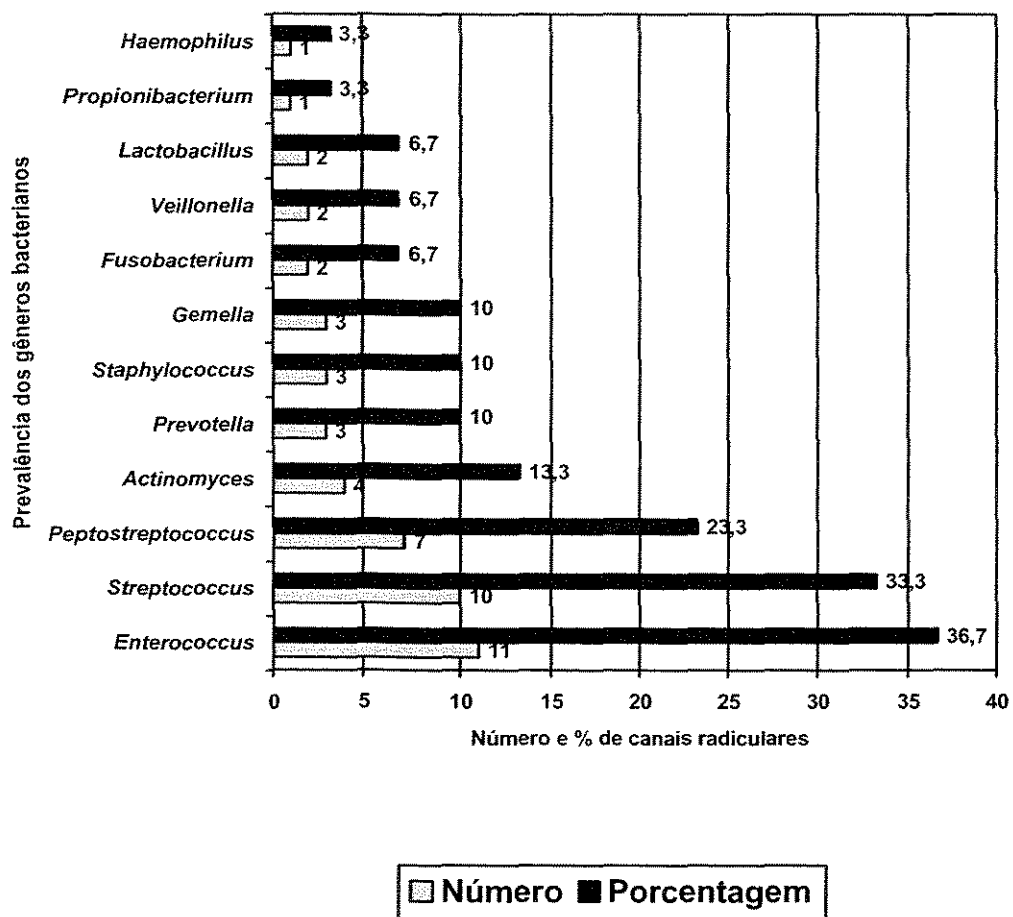


Figura 5.2. Frequência de bactérias anaeróbias estritas, anaeróbias facultativas, Gram-positivas e Gram-negativas.



**Figura 5.3.** Prevalência dos gêneros bacterianos isolados em 30 canais de dentes com insucesso endodôntico

**Tabela 5.4** - Valores das CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antibióticos testados contra *Enterococcus faecalis*

Caso n°	Bactéria	Benzilpenicilina (PG)	Amoxicilina (AC)	Amoxicilina + ác. clavulânico (XL)	Eritromicina (EM)	Azitromicina (AZ)
9	<i>E. faecalis</i>	3,0	0,75	0,75	8,0	24,0
12	<i>E. faecalis</i>	2,0	0,38	0,5	0,75	6,0
13	<i>E. faecalis</i>	1,5	0,5	0,5	0,75	4,0
18	<i>E. faecalis</i>	1,5	0,5	0,38	1,0	8,0
20	<i>E. faecalis</i>	1,5	0,5	0,38	0,5	4,0
23	<i>E. faecalis</i>	1,5	0,38	0,38	2,0	12,0
25	<i>E. faecalis</i>	3,0	0,5	0,5	>256	>256
26	<i>E. faecalis</i>	3,0	0,5	0,5	1,0	8,0
27	<i>E. faecalis</i>	2,0	0,5	0,5	1,0	4,0
29	<i>E. faecalis</i>	3,0	0,75	0,75	1,0	4,0

**Tabela 5.5** - Suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* baseadas nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S4 e M100 S10)

Caso n°	Bactéria	Benzilpenicilina (PG)	Amoxicilina (AC)	Amoxicilina + ác. clavulânico (XL)	Eritromicina (EM)	Azitromicina (AZ)
9	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	R	R
12	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	I	R
13	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	I	I
18	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	I	R
20	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	S	I
23	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	I	R
25	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	R	R
26	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	I	R
27	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	I	I
29	<i>E. faecalis</i>	S	S	S	I	I

S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente

**Tabela 5.6** - Valores das CIMs ( $\mu\text{g/mL}$ ) dos antibióticos testados contra espécies do gênero *Peptostreptococcus*

Caso n°	Bactéria	Benzilpenicilina (PG)	Amoxicilina (AC)	Amoxicilina + ácido clavulânico (XL)	Clindamicina (CM)
12	<i>P. micros</i>	0,25	0,5	0,75	0,38
13	<i>P. prevotii</i>	0,38	0,38	0,38	0,19
13	<i>P. magnus</i>	0,25	0,19	0,125	0,38
22	<i>P. prevotii</i>	0,125	0,25	0,25	0,25
24	<i>P. prevotii</i>	0,25	0,25	0,25	0,19
26	<i>P. prevotii</i>	0,094	0,25	0,19	0,25

**Tabela 5.7** - Suscetibilidade antimicrobiana de espécies do gênero *Peptostreptococcus* baseadas nos valores interpretativos da NCCLS

Caso n°	Bactéria	Benzilpenicilina (PG)	Amoxicilina (AC)	Amoxicilina + ácido clavulânico (XL)	Clindamicina (CM)
12	<i>P. micros</i>	S	S	S	S
13	<i>P. prevotii</i>	S	S	S	S
13	<i>P. magnus</i>	S	S	S	S
22	<i>P. prevotii</i>	S	S	S	S
24	<i>P. prevotii</i>	S	S	S	S
26	<i>P. prevotii</i>	S	S	S	S

S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente

## 6. DISCUSSÃO

Embora a maioria dos casos de insucesso endodôntico ocorra devido à permanência de uma infecção no sistema de canais radiculares, que resulta na persistência ou surgimento de uma lesão periapical após o tratamento, poucos são os estudos das bactérias associadas ao fracasso do tratamento endodôntico. O presente trabalho utilizou técnicas bacteriológicas avançadas para investigar quais microrganismos estariam associados ao insucesso endodôntico. Os resultados desse trabalho mostraram que a microbiota de canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio e lesão periapical, era composta, em sua maioria, de 1 ou 2 espécies, representadas principalmente por bactérias anaeróbias facultativas e Gram-positivas. Essa microbiota difere substancialmente dos canais radiculares com polpas necrosadas e não tratados endodonticamente, que apresentam uma infecção polimicrobiana, predominantemente anaeróbia, com proporções iguais de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SUNDQVIST 1989, 1992; BAUMGARTNER 1991; GOMES 1995; GOMES *et al.* 1994, 1996 a,b,c).

Microrganismos viáveis foram isolados de 24 (80%) dos 30 dentes estudados. Esses resultados estão de acordo com os achados de MOLANDER *et al.* (1998), que detectaram um crescimento bacteriano em 73,4% de 79 dentes retratados sem o uso de material solvente da guta-percha. SUNDQVIST *et al.* (1998) detectaram crescimento, também sem o uso de material solvente, em apenas 24 (44,4%) de 54 dentes com tratamento endodôntico prévio.

A presença de culturas negativas não significa a ausência total de microrganismos dos canais radiculares estudados. Embora as técnicas de coleta e cultura microbiológicas utilizadas na presente pesquisa, sejam altamente efetivas para o isolamento de bactérias extremamente sensíveis ao oxigênio (GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996a,b,c), é possível que alguns microrganismos tenham sido perdidos durante a coleta e processamento microbiológicos. SUNDQVIST *et al.* (1998) utilizaram técnicas de coleta semelhantes à utilizada nesse estudo, e discutiram, em seu trabalho, a dificuldade da coleta microbiológica em canais de dentes com tratamento endodôntico prévio. Microrganismos presentes em

áreas inacessíveis à coleta, como as ramificações do sistema de canais radiculares ou em áreas apicais que podem ter sido obliteradas durante o tratamento endodôntico prévio, ou ainda, se os microrganismos estiverem presentes em quantidade muito pequena no canal radicular, podem não ser isolados pela técnica da cultura microbiológica. Além disso, microrganismos podem ser eliminados durante a remoção do material obturador prévio, mesmo utilizando apenas métodos mecânicos e sem solventes. Apesar das dificuldades, os resultados das coletas microbiológicas de canais com tratamento endodôntico prévio são considerados representativos e de grande importância (SUNDQVIST *et al.*, 1998).

Dos 24 canais que apresentaram crescimento bacteriano, 13 canais abrigavam apenas 1 bactéria por canal radicular, 2 apresentavam 2 bactérias, e 9 apresentavam 3 ou mais microrganismos. No estudo de SUNDQVIST *et al.* (1998), dos 24 dentes que apresentaram crescimento bacteriano, 19 casos eram caracterizados como monoinfecções, 4 apresentavam 2 microrganismos, e apenas 1 caso apresentava uma cultura polimicrobiana contendo 4 espécies bacterianas. Essa diferença entre os trabalhos quanto à frequência de monoinfecções e infecções polimicrobianas, provavelmente se deve à qualidade do tratamento endodôntico. SUNDQVIST *et al.* (1998) analisaram dentes com tratamentos endodônticos considerados de boa qualidade em quase totalidade dos casos, com exceção de 1 canal que apresentava uma obturação bastante deficiente em selamento, que foi o único canal que apresentou infecção polimicrobiana. Em nosso estudo, os tratamentos de boa qualidade estavam presentes, aproximadamente, na metade dos casos; e dos 9 casos que continham três ou mais bactérias por canal radicular, 8 (Anexo VI - casos nº 5, 12, 13, 16, 19, 21, 22 e 26) apresentavam, radiograficamente, uma obturação de má qualidade e apenas 1 canal apresentava uma obturação considerada de boa qualidade. Houve, portanto, uma correlação entre o número de espécies bacterianas presentes no canal radicular e a qualidade da obturação.

Por outro lado, nenhuma associação foi encontrada quando analisados o número de espécies bacterianas por canal radicular e a presença ou ausência de restaurações coronárias. Dos 30 casos de insucessos estudados, 63,3% apresentavam restaurações definitivas e 36,7% apresentavam restaurações provisórias ou não estavam restaurados. Entretanto,

53,3% dos casos apresentavam obturações endodônticas de má qualidade. Esses resultados ressaltam a importância da qualidade da técnica endodôntica para o sucesso do tratamento, os quais discordam dos estudos de RAY & TROPE (1995) que concluíram que a qualidade da restauração coronária era um fator significativamente mais importante do que a qualidade da técnica endodôntica para a determinação do sucesso. CHEUNG (1996) relataram que as bactérias associadas ao insucesso endodôntico podem ser derivadas de bactérias presentes originalmente no canal radicular infectado, que sobreviveram após o preparo químico-mecânico e obturação deficiente, ou de bactérias que penetraram no canal após o tratamento endodôntico através de microinfiltrações coronárias. O sucesso do tratamento endodôntico depende, portanto, do controle da assepsia durante o tratamento, da máxima eliminação de microrganismos durante o preparo químico-mecânico, de uma obturação hermética e da prevenção da recontaminação do canal através de procedimentos restauradores adequados em um menor tempo possível após o tratamento endodôntico.

Do total de espécies bacterianas isoladas nesse estudo, 58% eram bactérias anaeróbias facultativas e 42% anaeróbias estritas, 80% bactérias Gram-positivas e 20% Gram-negativas. Esses resultados estão de acordo com os estudos anteriores. SUNDQVIST *et al.* (1998) encontraram 58% de bactérias anaeróbias facultativas, 42% de bactérias anaeróbias estritas, e 87% de microrganismos Gram-positivos, em dentes com canais radiculares tratados endodônticamente com lesões periapicais. MOLANDER *et al.* (1998) verificaram uma frequência de 69% de bactérias anaeróbias facultativas, e 74,3% de Gram-positivas.

Os gêneros bacterianos mais frequentemente isolados dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio foram: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Actinomyces*. Esses microrganismos também foram encontrados com frequência no estudo realizado por SUNDQVIST *et al.* (1998).

No presente estudo, *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequentemente isolada dos canais radiculares com fracasso do tratamento endodôntico, estando presente em 45,8% dos canais com culturas positivas. Esse resultado está de acordo



com os estudos prévios realizados por MOLANDER *et al.* (1998) e SUNDQVIST *et al.* (1998), que isolaram essa espécie bacteriana em 47% e 38%, respectivamente, dos canais radiculares infectados. Dos 11 casos isolados nesse estudo, 6 apresentavam o *Enterococcus faecalis* como microrganismo único presente no canal. Nos trabalhos de SUNDQVIST *et al.* (1998), dos 9 casos em que o *Enterococcus faecalis* foi isolado, ele era o único microrganismo encontrado no canal. Esses estudos confirmam os achados de FABRICIUS *et al.* (1982), que mostraram que *Enterococcus* apresentam a capacidade de sobreviver sozinhos em canais radiculares, sem o suporte de outras bactérias.

Uma espécie de *Candida* spp. foi isolada em 1 caso dos 30 canais estudados. Esse achado coincide com os estudos de SUNDQVIST *et al.* (1998), que isolaram *Candida albicans* em 2 de 54 canais; e de MOLANDER *et al.* (1998), que encontraram 3 fungos em 100 canais de dentes com tratamento endodôntico prévio. Esses resultados estão de acordo com as observações de NAIR (1990), que detectaram a presença de fungos, através da microscopia eletrônica de transmissão, em canais de dentes tratados endodonticamente, e relacionaram a presença desses microrganismos com o insucesso endodôntico.

*Staphylococcus aureus* foi isolado em um canal (caso n° 30, Anexo VI) como microrganismo único associado a uma infecção persistente de um dente com tratamento endodôntico prévio, após a remoção da guta-percha durante o retratamento. READER *et al.* (1994) também isolaram essa espécie bacteriana como único microrganismo associado a um caso de lesão periapical persistente ao tratamento endodôntico. Os autores discutiram a patogenicidade do *Staphylococcus aureus*, e relataram que embora essas espécies não sejam comumente isoladas dos canais radiculares, quando presentes, podem permanecer viáveis por longos períodos devido à sua alta resistência a alterações provocadas no meio. O caso relatado pelos autores foi solucionado após a realização de cultura microbiológica e teste de suscetibilidade antimicrobiana, que demonstrou resistência bacteriana à penicilina, à amoxicilina e ao metronidazol, e sensibilidade à amoxicilina associada ao ácido clavulânico, o qual foi administrado para auxiliar o tratamento da infecção persistente. Os autores ressaltaram a importância desses testes para a seleção correta da antibioticoterapia.

Porém, segundo ABBOTT *et al.* (1990), antibióticos não estão indicados para o tratamento de infecções endodônticas crônicas, exceto durante casos de exarcebações agudas com sinais de disseminação do processo infeccioso e envolvimento sistêmico. Entretanto, a utilização de agentes antimicrobianos sistêmicos pode ser indicada na profilaxia da endocardite bacteriana.

Segundo DEBELIAN *et al.* (1995) procedimentos durante o tratamento endodôntico podem lançar microrganismos do canal radicular para a corrente sanguínea. Os microrganismos que entram na corrente sanguínea refletem quantitativamente e qualitativamente a microbiota do local da infecção.

Segundo DAJANI *et al.* (1997), a endocardite infecciosa causada pelos *Streptococcus* do grupo *viridans* é mais comum após certas intervenções odontológicas, do trato respiratório superior e do esôfago, não sendo comum que esses microrganismos causem complicações em procedimentos invasivos do trato gastro-intestinal e genito-urinário. Similarmente, segundo os autores, a endocardite provocada por *Enterococcus* spp. seria uma consequência de intervenções do trato gastro-intestinal, e não seria uma consequência comum dos procedimentos odontológicos.

Os nossos resultados mostraram que *Enterococcus faecalis* estava presente em 45,8% dos canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico, o que sugere, baseado nos estudos de DEBELIAN *et al.* (1995), que em casos de retratamento endodôntico, esses microrganismos possam entrar na corrente sanguínea, causar uma bacteremia, e ser uma possível causa, em situações de risco, da endocardite bacteriana.

Para uma profilaxia antibiótica eficaz, os microrganismos que causam a infecção, assim como a sensibilidade antimicrobiana destes, devem ser conhecidos (GRAD, 1997). Segundo TOMASZ (1994), *Enterococcus* podem causar uma endocardite de difícil tratamento devido a um número crescente de espécies resistentes através da produção de beta-lactamases e de enzimas que inativam aminoglicosídeos ou espécies resistentes à vancomicina.

Os resultados dos testes de suscetibilidade de 10 cepas de *Enterococcus faecalis* isolados no presente trabalho mostraram que essas cepas foram sensíveis à benzilpenicilina, à amoxicilina e à amoxicilina + ácido clavulânico. As concentrações inibitórias mínimas da amoxicilina foram semelhantes as da amoxicilina + ácido clavulânico, e foram inferiores às concentrações inibitórias mínimas da penicilina; ou seja, necessita-se de uma concentração menor da amoxicilina para exercer uma ação bactericida contra a espécie *Enterococcus faecalis*, quando comparada à benzilpenicilina.

Esses resultados concordam com os achados de NORD & WADSTRÖM (1973) que verificaram que a ampicilina e a benzilpenicilina foram efetivas contra *Enterococcus faecalis*, sendo a ampicilina mais efetiva do que a penicilina. HEINTZ *et al.* (1975) e STERN *et al.* (1990) relataram que cepas de *Enterococcus faecalis* foram altamente sensíveis à ampicilina, porém apresentaram resistência à penicilina. Entretanto, trabalhos realizados por MATUSOW (1981) detectaram cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes à penicilina e à ampicilina.

Segundo as recomendações da NCCLS, as espécies de *Enterococcus* que são classificadas como suscetíveis à penicilina, à ampicilina e à amoxicilina (CIM < 8 µg/mL), necessitam de uma alta dose terapêutica para o tratamento de infecções enterocócicas sérias. Endocardites causadas por *Enterococcus* spp. requerem uma terapia combinada com alta dosagem de penicilina ou alta dosagem de ampicilina, ou vancomicina, associadas a gentamicina ou estreptomicina, para exercer ação bactericida.

As cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas apresentaram um padrão de suscetibilidade variando de intermediário a resistente quando testados com os antibióticos eritromicina e azitromicina, com este apresentando um maior número de cepas resistentes. Esses resultados estão de acordo com os achados de FASS (1993) que mostraram a azitromicina com menor eficácia contra *Enterococcus* quando comparada com a eritromicina.

Estudos de ZELDOW & INGLE (1962), ENGSTRÖM (1964), e MATUSOW (1981) não detectaram resistência à eritromicina entre as cepas de *Enterococcus* spp. isoladas dos canais radiculares. Porém estudos de NORD & WADSTRÖM (1973) mostraram que, embora a maioria das cepas de *Enterococcus faecalis* fosse sensível à eritromicina, havia uma grande variação no grau de suscetibilidade (CIM variando de 0,5- >128 µg/mL), havendo presença de cepas resistentes. Estudos realizados por HEINTZ *et al.* (1975) detectaram sensibilidade à eritromicina em 96%, suscetibilidade intermediária em 2%, e resistência em 2% dos casos estudados. STERN *et al.* (1990) detectaram sensibilidade em 61,2% das espécies de *Enterococcus* estudadas.

No presente estudo, observou-se também uma grande variação das CIMs (0,5->256 µg/mL) da eritromicina para inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis*, como observado no trabalho de NORD & WADSTRÖM (1973); porém 70% das espécies apresentaram um padrão de suscetibilidade intermediário (CIM de 1-4 µg/mL), e apenas 1 caso se apresentou sensível à eritromicina (CIM ≤ 0,5 µg/mL), com a presença de 2 cepas resistentes (CIM ≥ 8 µg/mL). Esses resultados demonstraram que as cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas nesse estudo necessitaram de uma maior concentração de eritromicina para sofrer inibição.

Segundo FORBES *et al.* (1998), quando um microrganismo se torna menos suscetível a um determinado agente antimicrobiano, do que o que era anteriormente observado, ele está adquirindo uma resistência biológica a essa droga. Os autores explicaram que a resistência biológica não coincide necessariamente com a resistência clínica, que só é adquirida quando esses microrganismos deixam de ser suscetíveis à droga de tal forma que essa não seja mais efetiva clinicamente. Os autores ressaltaram que o desenvolvimento da resistência antimicrobiana é um processo evolutivo, e que é de fundamental importância o seu conhecimento e acompanhamento.

As cepas de *Peptostreptococcus* spp., que são cocos Gram-positivos anaeróbios, foram altamente sensíveis à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. Esses resultados coincidem com os achados de YAMAMOTO *et al.* (1989)

que verificaram uma alta suscetibilidade de 60 espécies de *Peptostreptococcus* isoladas de canais radiculares com periodontites apicais agudas, quando testadas com drogas do grupo das penicilinas, relatando que espécies resistentes às penicilinas eram raras. Porém HUNT & MEYER (1983) detectaram o aparecimento de resistência entre espécies de *Peptostreptococcus*, verificando em seu estudo de 1983, que aproximadamente 15% das espécies isoladas eram resistentes a penicilina e a ampicilina, enquanto no estudo de 1978, nenhuma resistência havia sido encontrada entre essas espécies (HUNT *et al.*, 1978).

A clindamicina foi efetiva contra todas as espécies de *Peptostreptococcus* estudadas, confirmando os resultados de PETERS *et al.* (1992) que relataram uma boa atividade da clindamicina contra essas espécies. Nossos resultados coincidem com os trabalhos de ERNEST *et al.* (1977) e MATUSOW (1981) que verificaram 100% de atividade da clindamicina contra as bactérias anaeróbias estritas estudadas, incluindo espécies de *Peptostreptococcus*. Segundo MOENNING *et al.* (1989) e BAKER & FOTOS (1994), essa alta efetividade da clindamicina contra bactérias anaeróbias estritas se deve ao seu uso limitado, e alertam para a problemática do surgimento de resistência devido ao uso indiscriminado da droga.

Nossos resultados mostraram que a microbiota do dente tratado endodonticamente associado à lesão periapical é composta em sua maioria por bactérias anaeróbias facultativas e é predominantemente Gram-positiva, sendo *Enterococcus* o gênero bacteriano mais isolado, e *Peptostreptococcus* o gênero mais representativo das bactérias anaeróbias estritas presentes. Benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico apresentaram-se igualmente efetivas contra bactérias do gênero *Peptostreptococcus* quando comparadas a clindamicina. Entre as cepas de *Enterococcus faecalis*, a amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico apresentaram melhores resultados, ou seja, menores CIMs quando comparadas à penicilina. A amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico apresentaram atividade antibacteriana semelhante contra *Enterococcus faecalis*, com CIMs bem próximas, o que sugere que as cepas estudadas não apresentaram resistência devido à produção de beta-lactamases. Logo, em pacientes de risco ao desenvolvimento da endocardite bacteriana, ou quando indicada terapia antibiótica durante o retratamento

endodôntico, os resultados do nosso trabalho suportam a escolha da amoxicilina como primeira opção de droga terapêutica, por apresentar uma boa atividade antibacteriana e ser de baixo custo.

VIGIL *et al.* (1997) estudaram o padrão de suscetibilidade de microrganismos isolados de lesões periapicais refratárias ao tratamento endodôntico, e não encontraram evidências claras de resistência antibiótica significativa entre as cepas estudadas. Os resultados do nosso estudo, avaliando a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de canais com tratamento endodôntico e lesões periapicais persistentes, revelaram que cepas de *Enterococcus faecalis* apresentaram resistência à eritromicina e à azitromicina. Novas pesquisas, utilizando um número maior de amostras bacterianas, assim como o estudo de outros gêneros bacterianos, são necessárias para o maior conhecimento do padrão de suscetibilidade das bactérias associadas ao insucesso endodôntico.

## 7. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados obtidos e nas condições experimentais utilizadas nesse estudo, pode-se concluir que:

1. A microbiota dos canais de dentes tratados endodonticamente é composta em sua maioria por bactérias anaeróbias facultativas, predominantemente Gram-positivas, representadas pelos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus* e, em segundo plano, por bactérias anaeróbias estritas, em especial as do gênero *Peptostreptococcus*. Foram ainda isoladas bactérias dos gêneros *Actinomyces*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Gemella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* e *Haemophilus*.
2. As cepas de *Enterococcus faecalis* foram sensíveis à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina associada ao ácido clavulânico. Entretanto verificou-se, entre essas cepas, resistência bacteriana aos antibióticos eritromicina e azitromicina. As espécies dos gêneros *Peptostreptococcus* foram sensíveis à benzilpenicilina, à amoxicilina, à amoxicilina associada ao ácido clavulânico e à clindamicina.

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL  
SECÃO CIRCULANT

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT PV, HUME WR, PEARMAN JW (1990) Antibiotics and endodontics. *Australian Dental Journal* **35**, 50-60.

ABOU-RASS M & BOGEN G (1998). Microorganisms in closed periapical lesions. *International Endodontic Journal* **31**, 39-47.

ADA COUNCIL OF SCIENTIF AFFAIRS (1997) Antibiotics use in dentistry. *Journal of the American Dental Association* **128**, 648.

ALLEN RK, NEWTON CW, BROWN CE (1989) A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *Journal of Endodontics* **15**, 261-266.

ALVES J, BARRIESH K, WALTON R, WILCOX L, WERTZ P, DRAKE D (1996) Endotoxin penetration from mixed culture though obturated, post-prepared canals. *Journal of Endodontics* **22**, 212.

ANDRADE ED, PASSERI LA, MATTOS FILHO TR (1998) Prevenção da endocardite bacteriana – novas recomendações da American Heart Association. *Revista da Associação Paulista dos Cirurgiões-Dentistas* **52**, 353-7.

ANDRADE ED (1999) *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 188 p.

APPELBAUM PC, SPANGLER SK, JACOBS MR (1990)  $\beta$ -lactamase production and susceptibilities to amoxicilin, amoxicilin-clavulanate, ticarcilin, ticarcilin-clavulanate, cefoxitin, imipinem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* *Bacteroides* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 1546-50.



- APPELBAUM PC, SPANGLER SK, SHIMAN R, JACOBS MR (1992) Susceptibilities of 540 anaerobic Gram-negative bacilli to amoxicilin, amoxicilin-BRL 42715, amoxicilin-clavulanate, temafloxacin, and clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 1140-3.
- BAKER KA, FOTOS PG (1994) The management of odontogenic infections – a rationale for appropriate chemotherapy. *Dental Clinics of North America* **38**, 689-706.
- BAKER PJ, EVANS RT, SLOTS J, GENCO RJ (1985) Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from human oral cavity. *Journal of Dental Research* **64**, 1233-44.
- BARNARD D, DAVIES J, FIGDOR D (1996) Susceptibilities of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* **29**, 320-6.
- BARTHEL CR, STROBACH A, BRIEDIGKEIT H, GÖBEL U, ROULET JF (1999) Leakage in roots coronally sealed with different temporary fillings. *Journal of Endodontics* **25**, 731-4.
- BAUMGARTNER JC (1991) Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. *Current Opinion in Dentistry* **1**, 737-43.
- BAUMGARTNER JC, FALKER WA (1991) Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *Journal of Endodontics* **17**, 380-383.
- BAUMGARTNER JC, WATKINS BJ, BAE KS, XIA T (1999) Association of black-pigmented bacteria with endodontic infection. *Journal of Endodontics* **25**, 413-5.

- BENDER IB, SELTZER S (1952) Combination of antibiotics and fungicides used in treatments of the infected pulpless tooth. *Journal of the American Dental Association*, **29**, 235-41.
- BENDER IB, SELTZER S, SOTANOFF W (1966) Endodontic success-A reappraisal of criteria. Part II. *Oral Surgery* **22**, 790-802.
- BERG JO, NORD CE (1973) A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scandinavian Journal of Dental Research* **81**, 163-6.
- BERGENHOLTZ G, LEKHOLM U, MILTHON R, HEDEN G, ÖDESJÖ B, ENGSTRÖM B (1979) Retreatment of endodontic fillings. *Scandinavian Journal of Dental Research* **87**, 2147-24.
- BOLMSTRÖM A (1993) Susceptibility testing of anaerobes with E-test. *Clinical Infectious Diseases* **16** (Supplement 4), S367-70.
- BRIGGS PFA, SCOTT BJJ (1997) Evidence-based dentistry: endodontic failure – how should it be managed? *British Dental Journal* **183**, 159-64.
- BROWN DF (1992) The E-test challenged with selected strains. *Diagnostic and Microbiological Infectious Disease* **15**, 465-8.
- CAVALLERI G, CUZZOLIN L, URBANI G, BENONI G (1989) Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *Journal of Chemotherapy* **1**, 101-2.
- CHAMBERS HF, SANDE MA (1995) Antimicrobial agents. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9<sup>th</sup> edn. USA: Mc Grow-Hill Companies, pp 1032-1141.

- CHEUNG GSP (1996) Endodontic failures – changing the approach. *International Dental Journal* **46**, 131-8.
- CITRON DM, OSTAVARI MI, KARLSSON A, GOLDSTEIN EJC (1991) Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **29**, 2197-2203.
- CONTI R (1997) Análise fenotípica da suscetibilidade antimicrobiana de cepas de bactérias pigmentadas isoladas da cavidade bucal. São Paulo: Universidade de São Paulo -USP. Tese de Mestrado.
- CULLMANN W, FREI R, KRECH T (1993) Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. *Chemotherapy* **39**, 169-74.
- DAHLÉN G, MÖLLER AJR (1992) Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 444-75.
- DAHLÉN G, PIPATTANAGOVIT P, ROSLING B, MÖLLER AJR (1993) A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 375-82.
- DAJANI AS, BAWDON RE, BERRY MC (1994) Oral amoxicilin as prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? *Clinical Infectious Disease* **18**, 157-60.

DAJANI AS, TAUBERT KA, WILSON W, BOLGER AF, BAYER A, FERRIERI P, GEWITZ MH, SHULMAN S, NOURI S, NEWBURGER JW, HUTTO C, PALLASCH TJ, GAGE TW, LEVISON ME, PETER G, ZUCCARO G (1997) Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *Journal of the American Medical Association* **277**, 1794-1801.

DEBELIAN GJ, OLSEN I, TRONSTAD L (1992) Profiling of *Propionibacterium acnes* recovered from root canal and blood during and after endodontic treatment. *Endodontics and Dental Traumatology* **8**, 248-254.

DEBELIAN GJ, OLSEN I, TRONSTAD L (1994) Systemic diseases caused by oral microorganisms. *Endodontics and Dental Traumatology* **10**, 57-65.

DEBELIAN GJ, OLSEN I, TRONSTAD L (1995) Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endodontics and Dental Traumatology* **11**, 142-149.

DEVEAUX E, HILDEBERT P, NEUT C, BONIFACE B, ROMOND C (1992) Bacterial microleakage of Cavit, IRM, and TERM. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **74**, 634-43.

ENGSTRÖM B (1964) The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy* **15**, 87-106.

ENGSTRÖM B, HARD AF, SEGERSTAD L, RAMSTRÖM G, FROSTELL G (1964) Correlation of positive cultures with prognosis for root canal treatment. *Odontologisk Revy* **15**, 275-80.

ERNEST MA, CONTE MV, KEUDELL KC (1977) Antibiotic sensitivity patterns of facultative and obligate anaerobic bacteria from pulp canals. *Journal of Endodontics* **3**, 106-9.

- FABRICIUS L, DAHLÉN G, ÖHMAN AE, MÖLLER AJR (1982) Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. *Scandinavian Journal of Dental Research* **90**, 134-44.
- FASS RJ (1993) Erythromycin, clarithromycin, and azitromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 2080-6.
- FIDGOR D, SJÖGREN U, SUNDQVIST G, NAIR PNR (1992) Pathogenicity of *Actinomyces israelii* and *Arachnia propionica*: experimental infection in guinea pigs and phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear leucocytes *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 129-36.
- FINEGOLD SM & NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS WORKING GROUP ON ANAEROBIC SUSCEPTIBILITY TESTING (1988) Susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **26**, 1253-6.
- FORBES BA, SAHM DF, WEISSFELD AS (1998) *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10<sup>th</sup> edn. St Louis, MO, USA: Mosby, 1079 p.
- FRIEDMAN S, LOST C, ZARRABIAN M, TROPE M (1995) Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a Glass Ionomer cement sealer. *Journal of Endodontics* **21**,384-90.
- FRIEDMAN S, STABHOLTZ A (1986) Endodontic retreatment-case selection and technique. Part 1: criteria for case selection. *Journal of Endodontics* **12**, 28-33.

- FUKUSHIMA H, YAMAMOTO K, SAGAWA H, LEUNG KP, WALKER CB (1990) Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *Journal of Endodontics* **11**, 534-8.
- GILL CJ, PALLASCH TJ (1981) Clindamycin-associated pseudomembranous colitis: a potentially fatal adverse drug reaction. *Journal of the American Dental Association* **102**, 507-9.
- GOLDMAN M, PEARSON AH (1969) Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **28**, 897-905.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD (1994) Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *International Endodontic Journal* **27**, 291-298.
- GOMES BPFA (1995) *An investigation into the root canal microflora*. Manchester, UK: University of Manchester. PhD thesis.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD (1996a) Clinical significance of dental root canal microflora. *Journal of Dentistry* **24**, 47-55.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD (1996b) Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal* **29**, 235-241.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD (1996c) Association of endodontic signs and symptoms with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal* **29**, 69-75.
- GRAD HA (1997) Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan* **90**, 64-72.

- GREENBERG RN, JAMES RB, MARIER RL, WOOD WH, SANDERS CV, KENT JN (1979) Microbiologic and antibiotic aspects of infections in the oral and maxillofacial region. *Journal of Oral Surgery* **37**, 873-84.
- GUTIÉRREZ JH, BRIZUELA C, VILLOTA E (1999) Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation and overfilling of the root canals: a scanning electron microscopy study. *International Endodontic Journal* **32**, 40-8.
- HAAPASALO M, RANTA H, RANTA K (1983) Facultative Gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontologica Scandinava* **41**, 19-22.
- HARN WM, CHEN YHM, YUAN K, CHUNG CH, HUANG PH (1998) Calculus like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. *Endodontics Dental Traumatology* **14**, 237-40.
- HARRISON JW (1999) Antibiotics not always necessary. *Journal of the American Dental Association* **130**, 782.
- HEINTZ CE, DEBLINGER R, OLIET S (1975) Antibiotic sensitivities of enterococci isolated from treated root canals. *Journal of Endodontics* **1**, 373-6.
- HEPWORTH MJ, FRIEDMAN S (1997) Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *Journal of Canadian Dental Association* **63**, 364-371.
- HUNT DE, KING TJ, FULLER GE (1978) Antibiotic susceptibility isolated from oral infections. *Journal of Oral Surgery* **36**, 527-9.

HUNT DE, MEYER RA (1983) Continued evolution of the microbiology of oral infections. *Journal of the American Dental Association* **107**, 52-4.

IDA RD, GUTMANN JL (1995) Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endodontics Dental Traumatology* **11**, 199-203.

IMURA N, OTANI SM, CAMPOS MJA, JARDIM EG, ZUOLO ML (1997) Bacterial penetration through temporary restorative materials in root-canal-treated teeth *in vitro*. *International Endodontic Journal* **30**, 381-5.

IWU C, MACFARLANE TW, MACKENZIE D, STENHOUSE D (1990) The microbiology of periapical granulomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **69**, 502-5.

JACOBS MR, SPANGLER SK, APPELBAUM PC (1990) Beta-lactamase production, beta-lactam sensitivity and resistance to synergy with clavulanate of 737 *Bacteroides fragilis* group organisms from thirty three US centers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **26**, 361-70.

JOHNSON CC (1993) Susceptibility of anaerobic bacteria to  $\beta$ -lactam antibiotics in the United States. *Clinical Infectious Diseases* **16(Supplement 4)**, S371-6.

KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **20**, 340-9.

KELLER DL, PETERS DD, SETTERSTROM J, BERNIER WE (1981) Microleakage of softened temporary restorations as determined by microorganism penetration. *Journal of Endodontics* **7**, 413-7.



- KIRYU T, HOSHINO E, IWAKU M (1994) Bacteria invading periapical cementum. *Journal of Endodontics* **20**, 169-172.
- LAGE-MARQUES JL, FENYO-PEREIRA M, SAFIOTI LML (1996) Análise radiográfica da qualidade do tratamento endodôntico e suas alterações. *Revista Brasileira de Odontologia* **53**, 11-5.
- LE GOFF A, BUNETEL L, MOUTON C, BONNAURE-MALLET M (1997) Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiology and Immunology* **12**, 318-322.
- LEWIS RD, BLOCK RM (1988) Management of endodontic failures. *Oral Surgery* **66**, 711-21.
- LIN ML, PASCON EA, SKRIBNER J, GÄNGLER P, LANGELAND K (1991) Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **11**, 603-11.
- LIN ML, PASCON EA, SKRIBNER J, GÄNGLER P, LANGELAND K (1992) Factors associated with endodontic treatment failures. *Journal of Endodontics* **18**, 625-7.
- LOMÇAH G, SEM BH, ÇANKAYA H (1996) Scanning electron microscopy observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endodontics Dental Traumatology* **12**, 70-6.
- LOPES HP, SIQUEIRA JR. JF, ELIAS CN (1999) Retratamento endodôntico. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, eds. *Endodontia Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro, RJ, BR: Medsi, pp. 497-538.

- MAGURA ME, ABDEL HK, BROWN CE, NEWTON CW (1991) Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: an in vitro study. *Journal of Endodontics* **17**, 324-31.
- MALOOLEY J, PATTERSON SS, KAFRAWY (1979) Response of periapical pathosis to endodontic treatment in monkeys. *Oral Surgery* **47**, 545-54.
- MATUSOW RJ (1981) Acute-alveolar cellulitis syndrome. Part II. Clinical assesment of antibiotic effectiveness against microbes isolated frm intact teeth. *Oral Surgery* **52**, 187-96.
- MIRANDA VC (1969) Identificação de microrganismos resistentes ao tratamento endodôntico, com especial referência aos estreptococos. *Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara* **3**, 73-95.
- MOENNING JE, NELSON CL, KOHLER RB (1989) The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **47**, 976-85.
- MOLANDER A, REIT C, DAHLEN G, KVIST T (1998). Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **31**, 1-7.
- MÖLLER AJR (1966) *Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies*. Göteborg, Sweden: Akademiförlaget.
- MÖLLER AJR, FABRICIUS L, DAHLÉN G, OHMAN A, HEYDEN G (1981) Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* **89**, 475-84.

- MOLVEN O, OLSEN I, KERKES K (1991) Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endodontics Dental Traumatology* **7**, 226-9.
- NACHNANI S, SCUTERI A, NEWMAN MG, AVANESSIAN AB, LOMELI SL (1992) E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *Journal of Periodontology* **63**, 576-83.
- NAIR PNR, SCHOEDER HE (1984). Periapical Actinomycosis. *Journal of Endodontics* **10**, 567-570.
- NAIR PNR (1987) Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics* **13**, 29-39.
- NAIR PNR, SJÖGREN U, KREY G, KAHNBERG KE, SUNDQVIST G (1990a) Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics* **16**, 580-8.
- NAIR PNR, SJÖGREN U, KREY G, SUNDQVIST G (1990b) Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *Journal of Endodontics* **16**, 589-95.
- NAIR PNR, SJÖGREN U, SCHIMACHER E, SUNDQVIST G (1993) Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post treatment follow-up. *International Endodontic Journal* **26**, 225-33.
- NAIR PNR, SJÖGREN U, FIDGOR D, SUNDQVIST G (1999) Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **87**, 617-27.

NAKANO-HASEGAWA M, YAMMAZAKI S, KANEDA Y, TAKIZAWA H, MAEDA N, NAKAMURA J (1999) The formation of biofilms by microorganisms isolated from infected root canals. *Journal of Endodontics* **25**, 299.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) M100-S8 M11-A4 Table 1, **17**, 22.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000) M100-S10 Table 2D, pp. 26-8.

NGUI-YEN JH, BRYCE EA, PORTER C, SMITH JA (1992) Evaluation of the E-test by using selected Gram-positive bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* **30**, 2150-2.

NORD CE, WORDSTRÖM T (1973) Susceptibility of haemolytic oral enterococci to eight antibiotics *in vitro*. *Acta Odontologica Scandinava* **31**, 395-9.

NORD CE (1982) Anaerobic bacteria in septicaemia and endocarditis. *Scandinavian Journal of Infectious Disease* **31**, 95-104.

NORD CE, HEIMDAHL A (1990) Cardiovascular infections: bacterial endocarditis of oral origin. Pathogenesis and prophylaxis. *Journal of Clinical Periodontology* **17**, 494-6.

OLSSON-LILJEQUIST B (1992) E-test as a routine MIC tool for reference work. *Diagnostic and Microbiological Infectious Disease* **15**, 479-82.

PALMER RJ, WHITE DC (1997) Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in Microbiology* **5**, 435-40.

- PARILLO JE (1979) Endocarditis due to resistant *viridans streptococci* during oral penicilin chemoprophylaxis. *New England Journal of Medicine* **300**, 296.
- PETERS DH, FRIEDEL HA, MCTAVISH D (1992) Azitromycin – a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* **44**, 750-99.
- PITT FORD TR (1982) The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. *International Endodontic Journal* **15**, 16-22.
- QUALITY ASSURANCE GUIDELINES (1987) Chicago, American Association of Endodontics, pp 1-27.
- RANTA K, HAAPASALO M, RANTA H (1988) Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aureginosa*. *Endodontics and Dental Traumatology* **4**, 269-72.
- RASMUSSEN BA, BUSH K, TALLY FP (1993) Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clinical Infectious Diseases* **16(Supplement 4)**, S390-400.
- RAY HA, TROPE M (1995) Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *International Endodontic Journal* **28**, 12-8.
- READER CM, BONIFACE M, BUJANDA-WAGNER S (1994) Refractory endodontic lesion associated with *Staphylococci aureus*. *Journal of Endodontics* **20**, 607-9.
- REIT C (1987) Decision strategies in endodontics: on the design of a recall program. *Endodontic Dental Traumatology* **3**, 233-9.

- ROSAN B (1997) Os estreptococos. In: Nisengarden RJ, Newman MG, eds. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, RJ, BR: Guanabara Koogan, pp. 110-25.
- ROSENBLATT JE, BROOK I (1993) Clinical relevance of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clinical Infectious Diseases* **16(Supplement 4)**, S446-8.
- ROTIMI V, KROURSHEED M, BRAZIER JS, JAMAL WY (1999) *Bacteroides* species highly resistant to metronidazole: an emerging clinical problem? *Clinical Microbiology and Infection* **5**, 166-69.
- RUDDLE CJ (1997) Micro-endodontic nonsurgical retreatment. *Dental Clinics of North America* **41**, 429-55.
- SANDS T, PYNN BR, KATSIKIERIS N (1995) Odontogenic infections: microbiology, antibiotics and management. *Oral Health*, June, 11-29.
- SAPICO FL, SARMA RJ (1982) Infective endocarditis due to anaerobic and microaerophilic bacteria. *Western Journal of Medicine* **137**, 18-23.
- SAPICO FL, ALDRIDGE KE (1993) What important problems remain in the areas of anaerobic bacteriology and anaerobic infections? *Clinical Infectious Disease* **16 (supplement 4)**, 451-2.
- SATO T, HOSHINO E, UEMATSU H, NODA T (1993) Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microbiological Ecology in Health and Disease* **6**, 269-75.
- SIQUEIRA JR JF (1997) Lesões periapicais podem ser infectadas? Visão crítica do problema. *Revista Brasileira de Odontologia* **54**, 43-6.

- SIQUEIRA JR JF, LOPES HP (1999) Microbiologia endodôntica. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, eds. *Endodontia Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro, RJ, BR: Medsi, pp.185-216.
- SIREN EK, HAAPASALO PP, RANTA K, SALMI P, KEROSUO ENJ (1997) Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal* **30**, 91-5.
- SJÖGREN U, HAPPONEN RP, KAHNBERG KE, SUNDQVIST G (1988) Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *International Endodontic Journal* **21**, 277-282.
- SJÖGREN U, HÄGGLUND B, SUNDQVIST G, WING K (1990) Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *Journal of Endodontics* **16**, 498-504.
- SJÖGREN U., FIDGOR D, PERSSON S, SUNDQVIST G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **30**, 297-306.
- SMITH CS, SETCHELL DJ, HARTY FJ (1993) Factors influencing the success of conventional root canal therapy-a five-year retrospective study. *International Endodontic Journal* **26**, 321-33.
- STERN MH, DREIZEN S, OTT T, LEVY BM (1990) Analysis of positive cultures from endodontically treated teeth: a retrospective study. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **69**, 366-71.
- STRINDBERG LZ (1956) The dependence of the results of pulp therapy on certain factors: an analytical study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odontologica Scandinava* **14 (supplement 21)**, 1-175.

- SUNDQVIST G & REUTERVING CO (1980) Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. *Journal of Endodontics* **6**, 602-6.
- SUNDQVIST G, JOHANSSON E, SJÖGREN U (1989) Prevalence of black-pigmented Bacteroides species in root canal infections. *Journal of Endodontics* **15**, 13-18.
- SUNDQVIST G (1992a) Ecology of root canal flora. *Journal of Endodontics* **18**, 427-430.
- SUNDQVIST G (1992b) Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 257-62.
- SUNDQVIST G (1994) Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. . *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **78**, 522-30.
- SUNDQVIST G, FIDGOR D, SJOGREN U (1998). Microbiology analyses of teeth wiyh endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **85**, 86- 93.
- SWARTZ DB, SKIDMORE AE, GRIFFIN JA (1983) Twenty years of endodontic success and failure. *Journal of Endodontics* **9**, 198-202.
- TAKAHASHI K (1998) Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal* **31**, 311-25.
- TANI N, TOMINAGA N, OSADA T, WATANABE K, UMEMOTO T (1992) Immunobiological activities of bacteria isolated from the root canals of postendodontic teeth with persistent periapical lesions. *Journal of Endodontics* **18**, 58-62.



- TOMASZ A (1994) Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. *The New England Journal of Medicine* **28**, 1247-51.
- TORABNEJAD M, UNG B, KETTERING JD (1990) *In vitro* bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *Journal of Endodontics* **16**, 566-9.
- TRONSTAD L, BARNETT F, RISO K, SLOTS J (1987) Extra-radicular endodontic infection. *Endodontics and Dental Traumatology* **3**, 86-90.
- TRONSTAD L, BARNETT F, CERVONE F (1990) Periapical bacterial plaque in teeth with refractory to endodontic treatment. *Endodontics Dental Traumatology* **6**, 73-7.
- TROWBRIDGE HO, STEVENS BH (1992) Microbiologic and pathologic aspects of pulpal and periapical disease. *Current Opinion in Dentistry* **2**, 85-92.
- VAN NIEUWENHUYSEN JP, AOUAR M, D'HOORES W (1994) Retreatment or radiographic monitoring in endodontics. *International Endodontic Journal* **27**, 75-81.
- VAN STEENBERGEN TJM., VAN WINKELHOFF AJ, GRAAF FJ, DUERDEN BI (1993) Antibiotic Susceptibilities of black pigmented Gram-negative anaerobes. *Immunology and Medical Microbiology* **6**, 229-234.
- VIGIL GV, WAYMAN BE, DAZEY SE, FOWLER CB, BRADLEY DV (1997). Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *Journal of Endodontics* **23**, 110-114.
- WALKER (1992) Antimicrobial agents and chemotherapy. *In*: Slots J, Taubman MA, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 242-64.

- WALTIMO TMT, SIREN EK, TORKKO HLK, OLSEN I, HAAPASALO MPP (1997) Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **30**, 96-101.
- WALTIMO TMT, SIREN EK, ORSTAVIK D, HAAPASALO MPP (1999) Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *International Endodontic Journal* **32**, 94-8.
- WALTON RE, CHIAPPINELLI J (1993) Prophylactic penicilin: effect on posttreatment symptoms following root canal treatment of asymptomatic periapical pathosis. *Journal of Endodontics* **19**, 466-70.
- WASFY MO, MCMAHON K., MINAH GE, FALKER WA (1992) Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 100-5.
- WAYMAN BE, MURATA SM, ALMEIDA RJ, FOWLER CB (1992) A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *Journal of Endodontics* **18**, 152-5.
- WEXLER HM, MOLITORIS E, FINEGOLD SM (1991) Effect of  $\beta$ -lactamase inhibitors on the activities of various  $\beta$ -lactam agents against anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 1219-24.
- WEXLER HM (1993) Susceptibility testing of anaerobic bacteria - the state of the art. *Clinical Infectious Diseases* **16 (Supplement 4)**, S328-33.
- YAMAMOTO K, FUKUSHIMA H, TSUCHYA H, SAGAWA H (1989) Antimicrobial susceptibilities of *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, and *Bacteroides* isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *Journal of Endodontics* **15**, 112-6.

ZELDOW BJ, INGLE JJ (1962) Management of periapical infection: antibiotic sensitivity of bacteria isolated from root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **15**, 721-6.

## **ANEXO I**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO ESPECÍFICO PARA A PESQUISA**

Projeto de Pesquisa: “INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO”

A presente pesquisa visa a identificação de bactérias que podem ser encontradas nos canais radiculares dos dentes com insucesso de tratamento endodôntico. Descobrimo estas bactérias iremos correlacioná-las com os aspectos clínicos como a dor, edema (inchaço), exsudato purulento (pus) e então poderemos saber se elas estão mesmo envolvidas nestas condições. Isto poderá ajudar a entendermos a base de certos sinais e sintomas de origem endodôntica . Deste trabalho poderá também sugerir um nova linha de tratamento onde serão usados métodos antibacterianos específicos para suplementar o programa de tratamento convencional, nesses casos de infecções persistentes clinicamente importantes.

A coleta de amostra é simples e faz parte do tratamento endodôntico, não existindo outro método alternativo para tal. Ela consiste em colocar um cone de papel absorvente dentro do canal, no comprimento pré-determinado através da radiografia. Este cone normalmente é usado para secar o canal. Nesta pesquisa, depois de secar o canal, ele será colocado num meio de cultura líquido, o qual será posteriormente analisado microbiologicamente. O processo é indolor. Se o paciente sentir dor, esta não será devido a coleta de amostra e sim a persistência da infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais. Se a manifestação dolorosa ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, o paciente poderá ser atendido no Plantão de Emergência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 hs e de 13:30 às 17:30 hs.

A pesquisa não acarretará nenhum ônus ao paciente. Se por acaso houver necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional, os gastos com este deslocamento serão ressarcidos. Se o paciente se recusar a participar ou retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, este

não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente. Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos serem divulgados publicamente, será preservada a privacidade do indivíduo quanto aos dados confidenciais que possam a ser envolvidos na pesquisa.

#### TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Declaro para os devidos fins que eu, -----, me disponho a participar da pesquisa intitulada “INVESTIGAÇÃO DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO INSUCESSO DO TRATAMENTO ENDODÔNTICO” e permito a divulgação dos dados clínicos e microbiológicos obtidos desta pesquisa. Estou ciente dos objetivos desta pesquisa e de todos os procedimentos e concordo com a metodologia para coleta de amostras microbiológicas dos canais radiculares do(s) dente(s) submetido(s) ao tratamento endodôntico, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP. Estou também ciente de minha liberdade de recusar a participar ou retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem ser penalizado e sem prejuízo ao meu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Assinatura:

Local e data:

## ANEXO II – Meios de cultura

### 1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M (Bury, UK)

#### 1.1. Descrição

Meio primário de isolamento capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios de maiores implicações clínicas.

As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes desintoxicantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” produtores de pigmento preto. Agentes específicos de estimulação de crescimento são os seguintes: cisteína para o *Fusobacterium necrophorum*, *Propionibacterium acnes* e *Bacteroides fragilis*; arginina para *Eubacterium* spp., pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*. Piruvato contribui a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia. Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e álcoois que poderiam inibir o crescimento bacteriano.

#### 1.2. Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

### 1.3. Aparência

Vermelho devido a adição de sangue. O meio fica escuro (reduzido) mais tarde devido a adição de redutores.

### 1.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

### 1.5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

### 1.6. Incubação

37 °C anaerobicamente, por períodos de 48 horas e 7 dias.

### 1.7. Fórmula

Fórmula	g/L
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido	1,0
Agar no. 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
HCL cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5

pH: 7,4 ± 0,2



O meio FAA pode ser seletivo para várias espécies de anaeróbios através da adição de antibióticos seletivos.

2. FAA + ácido nalidíxico (X 091) – LAB M (Bury, UK)

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos.

Para o preparo de 500 ml de FAA, um vidro de pó de ácido nalidíxico (X091) é diluído em 5 ml de água destilada, e adicionado assepticamente ao meio esterilizado e resfriado a 47 °C. A concentração final de ácido nalidíxico é de 0,01 mg/ml.

3. FAA + ácido nalidíxico + vancomicina (X 090) - LAB M (Bury, UK)

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-negativos. A concentração final de ácido nalidíxico é de 0,01 mg/ml, e da vancomicina é de 0,0025 mg/ml.

4. FAA + neomicina (X 015) - LAB M (Bury, UK)

Quando adicionado ao ágar-sangue, resultará em um meio que permite o crescimento de *Clostridium* e outros anaeróbios, como *Bacteroides fragilis* e alguns cocos anaeróbios. A concentração final de neomicina é de 0,075 mg/ml.

## 5. Fastidious Anaerobe Broth (FAB) - LAB M (Bury, UK)

### 5.1. Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o Eh (redox) do meio e o ágar inibe a absorção do oxigênio.

### 5.2 Preparo

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização, que é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

### 5.3 Aparência

Amarelo claro.

### 5.4 Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20°C no escuro.

### 5.5 Inoculação

Se usado como meio de cultura com sangue, uma diluição mínima de 1:10 deve ser usada.

## 5.6 Incubação

37 °C por 24-72 horas. Tubos bem fechados.

## 5.7. Fórmula

Fórmula	g/L
Mistura de peptonas	15,0
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Agar no. 1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4

pH: 7,4 ± 0,2

## 6. Brucella Ágar

### 6.1 Descrição

As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação do crescimento bacteriano. A glicose fornece fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios. O nível alto de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e de alcoois que poderiam inibir o crescimento microbiano. O ágar inibe a absorção do oxigênio.

### 6.2 Preparo

Dispensar 22,5 g do pó em 500mL de água deionizada, adicionar 500µL da solução de hemina (5mg/mL) e 500µL da solução de vitamina K (1 mg/mL), as quais são preparadas previamente e são adicionadas ao meio para melhorar o crescimento de alguns microrganismos. Misturar todos os ingredientes e agitar a suspensão, que é esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue de carneiro desfibrinado, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

### 6.3. Aparência

Vermelho devido a adição de sangue. O meio fica escuro após acrescentar a hemina.

### 6.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

### 6.5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

## 6.6. Incubação

37 °C anaerobicamente, por períodos de 48 horas e 7 dias.

## 6.7. Fórmula

Fórmula	g/L
Peptonas	10,0
Extrato de carne	5,0
Cloreto de sódio	5,0
Glicose	5,0
Ágar	15,0

pH: 7,5 ± 0,2

## 7. Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid, Unipath Ltd, Basingstoke, Inglaterra)

### 7.1. Descrição:

Meio para testes de sensibilidade antimicrobiana onde pode se utilizar todas as técnicas estandardizadas reconhecidas internacionalmente como por exemplo o método de difusão usando discos ou poços. Este meio, usado na técnica de Bauer-Kirby, foi adotado pelo "National Committee for Clinical Laboratory Standards" (NCCLS) nos EUA como um meio ideal para teste de suscetibilidade. O meio tem uma pequena quantidade de timina e timidina, permitindo seu uso nos testes de trimetropim e sulfonamida para assegurar os tamanhos corretos dos halos de inibição obtidos pelos antibióticos aminoglicosídeos e tetraciclina. Foi originalmente formulado como um meio para isolamento de espécies patogênicas de *Neisseria*.

### 7.2 Método para reconstituição:

Dispensar 19,0 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. E esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C. Misturar bem e distribuir nas placas de petri.

### 7.3 Aparência: Amarela clara (sem sangue)

### 7.4 Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4°C no escuro

### 7.5 Inoculação

Em superfície, de acordo com o NCCLS.

### 7.6 Incubação

37<sup>0</sup>C aerobicamente por 16-18 h

7.7.	Fórmula	g/L
	Carne de vaca, de infusão desidratada	300,0
	Hidrolisado de caseína	17,5
	Amido	1,5
	Agar no. 1	17,0
	ions cálcio	50-100 mg/L
	ions magnésio	20-35 mg/L

pH: 7,4 ± 0,2



Figura II. Meios de Cultura



**ANEXO III - Meio de transporte VMGA III - Viability Medium Göteborg Agar (descrito por DÁHLEN *et al.*, 1993)**

1. Descrição

Meio de transporte para amostragens pequenas como, por exemplo, com ponta de papel absorvente. Apresenta uma consistência semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluida acima de 30 °C.

2. Preparo

Solução 1

Água destilada estéril	540 mL
Triptose (DIFCO, Detroit, EUA)	0,5 g
Thitone e Peptone (BBL, Cockeysville, EUA)	0,5 g

Dissolver com agitação e aquecimento.

Solução 2

Água destilada estéril	50 mL
Bacto ágar 4% (DIFCO, Detroit, EUA)	2 g

Autoclavar a 121 °C por 20 minutos.

Solução 3

Água destilada estéril previamente aquecida	300 mL
Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA)	0,5 g

Dissolver com agitação e aquecimento.

4. Ácido tioglicólico (SIGMA, St Louis, EUA)	0,5 mL
5. Solução dos sais de estoque*	100 mL
6. Solução de cisteína	
L-cisteína-dihidroclorito (SIGMA, St Louis, EUA)	0,5 g
Água destilada estéril	10 mL

Misturar as soluções 1, 2 e 3 em um frasco de 2 L, na manta. Resfriar a 45-50 °C. Adicionar à mistura 100 mL da solução de estoque de sais\*. Adicionar 0,5 mL de ácido tioglicólico. Aquecer a solução por 5 minutos até que a cor azul desapareça (fica amarelo depois que ferve). Resfriar em água morna sob fluxo de N<sub>2</sub>. Levar para a câmara de anaerobiose. Adicionar 10 mL da solução de cisteína. Ajustar o pH 7,2 com uma solução de 8 M NaOH + 8 KOH. Colocar 1 mL da solução em cada tubo de Eppendorf e deixar levemente aberto. Permitir que os tubos fiquem na cabine de anaerobiose por pelo menos 2 horas. Depois de remover os tubos da cabine, feche-os firmemente. Autoclavar em 115 °C por 20 minutos.

\*Sais de estoque

- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| 1. Água destilada estéril     | 300 ml |
| Acetato de fenilmercuriocromo | 0,5 g  |

Dissolver em banho-maria durante a noite a 56 °C.

- |                           |        |
|---------------------------|--------|
| 2. Água destilada estéril | 200 ml |
| Glicerofosfato de sódio   | 0,5 g  |

Dissolver aquecendo levemente na manta

- |   |        |
|---|--------|
| 3. Água destilada estéril   | 300 ml |
| Cloreto de cálcio hidratado (CaCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O)   | 1,6 g  |
| Cloreto de potássio (KCl)   | 4,2 g  |
| Cloreto de sódio (NaCl)   | 10,0 g |
| Sulfato de magnésio hidratado (MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O) | 1,0 g  |

Misturar a solução 1,2 e 3 bem dissolvidas e resfriadas em uma proveta graduada e adicionar água destilada estéril até completar o volume de 1000 mL. Adicionar 0,03 g de azul de metileno, e colocar em frascos de 100 mL de solução de sal.

#### ANEXO IV - Câmara de anaerobiose

A câmara de anaerobiose consiste em uma câmara de incubação, feita de resina acrílica e tem a capacidade de armazenar placas de petri de até 180 x 90 mm. O acesso à cabine feito através de portas com luvas de borracha.

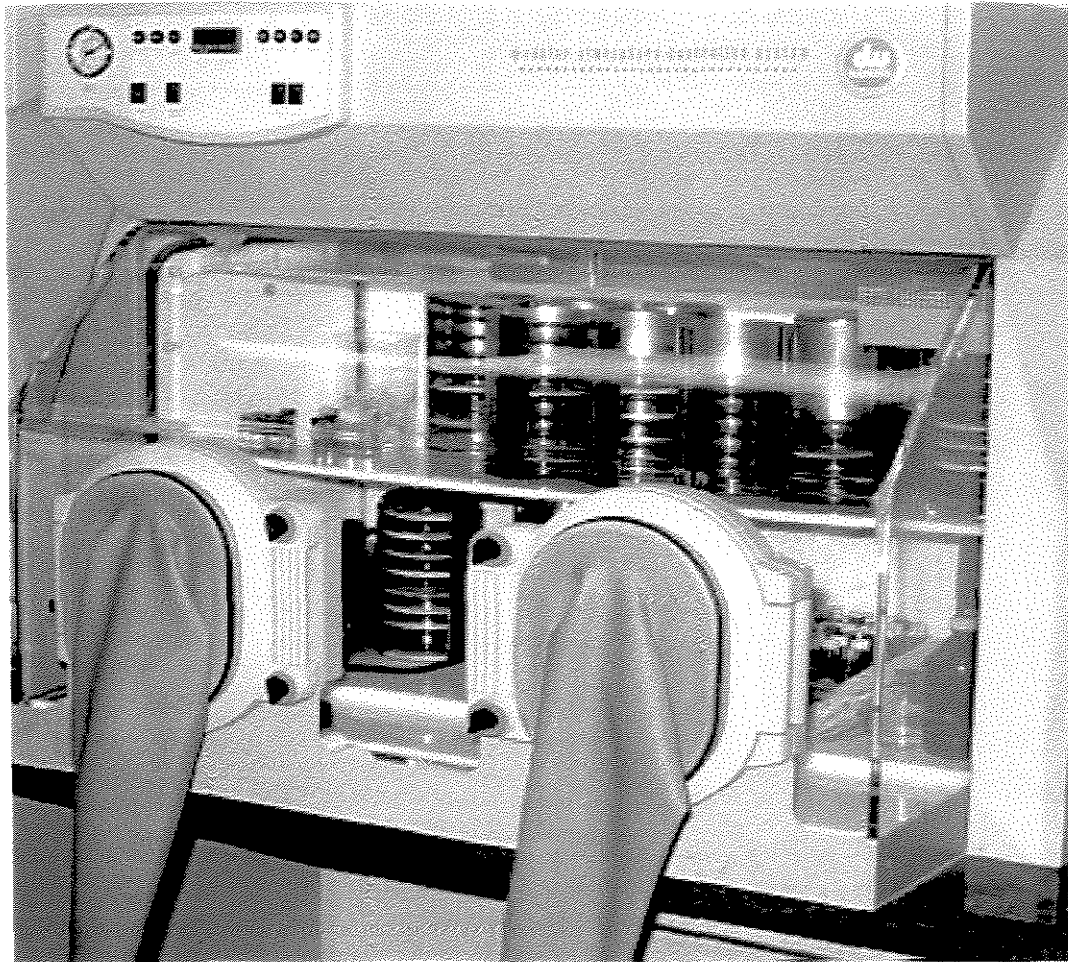
Um controlador de temperatura digital indica e mantém uma temperatura constante no interior da cabine.

A cabine utiliza o sistema “Anotox” e o catalisador Palladium Deoxo “D” para manter anaerobiose estrita dentro da cabine e evitar a formação de metabólitos voláteis tóxicos. A função do “Anotox” é purificar a atmosfera pela remoção de ácidos graxos voláteis e hidrogênio sulfúrico da atmosfera. A função do catalisador Palladium Deoxo “D” é catalisar rastros de oxigênio dentro da câmara via hidrogênio, o qual também está dentro da câmara. O vapor de água produzido pelo catalisador é removido automaticamente por um sistema de controle de umidade. O catalisador Palladium Deoxo “D” e o “Anotox” devem ser trocados uma vez por ano no serviço de manutenção. Se eles ficarem muito úmidos durante o uso, devem ser removidos e secados. O “Anotox” que é feito de material plástico deve ser seco numa incubadora com temperatura de 37°C – 60°C por algumas horas. O sachê catalisador que é feito de aço inoxidável deve ser seco em forno a 160°C por uma ou duas horas.

O controle de anaerobiose no interior da cabine é feito com uma solução de azul de metileno ou outro indicador de redução de oxigênio.

A cabine apresenta um controle de umidade que permite que qualquer excesso de umidade condensada nas placas seja canalizada para fora da câmara.

A iluminação na cabine é feita por luzes fluorescentes.



**Figura IV.1.** Câmara de anaerobiose

## ANEXO V – Kits de identificação bacteriana

### 1. Api 20 Strep

#### 1.1. Descrição

Api 20 Strep é um método padronizado que combina 20 testes bioquímicos que permitem a identificação, em grupos ou espécies, da maioria dos *Streptococcus* encontrados na microbiologia médica.

A fita do Api 20 Strep consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares.

Os testes enzimáticos são inoculados com uma suspensão densa de microrganismos, feita de uma cultura pura, que é utilizada para reidratar os substratos enzimáticos. Os produtos metabólicos finais produzidos durante o período de incubação são revelados através de reações caracterizadas por alterações cromáticas que ocorrem espontaneamente ou por adição de reagentes.

Os testes de fermentação são inoculados com um meio enriquecido (API GP Medium) que reconstituem os substratos de açúcares. A fermentação de carboidratos é detectada por uma mudança no indicador de pH.

As reações são lidas de acordo com o quadro de leitura do manual do fabricante, e a identificação obtida no catálogo “Api 20 Strep Analytical Profile Index”.

## 1.2. Materiais

Um Kit contém:

- 25 fitas API 20 STREP
- 25 caixas para incubação
- 25 ampolas de API GP Medium
- 25 folhas de resposta
- 25 swabs

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Meio para suspensão: Suspension Medium, 2 ml
- Reagentes: NIN, VP 1, VP 2, ZYM A, ZYM B
- Padrão de McFarland
- Pipetas plásticas
- Óleo mineral
- Catálogo: Api Staph Analytical Profile Index
- Rack para ampolas
- Placas de ágar-sangue

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Busen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

### 1.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativa e anaeróbios facultativos.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio para suspensão “Suspension Medium” ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4.

Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

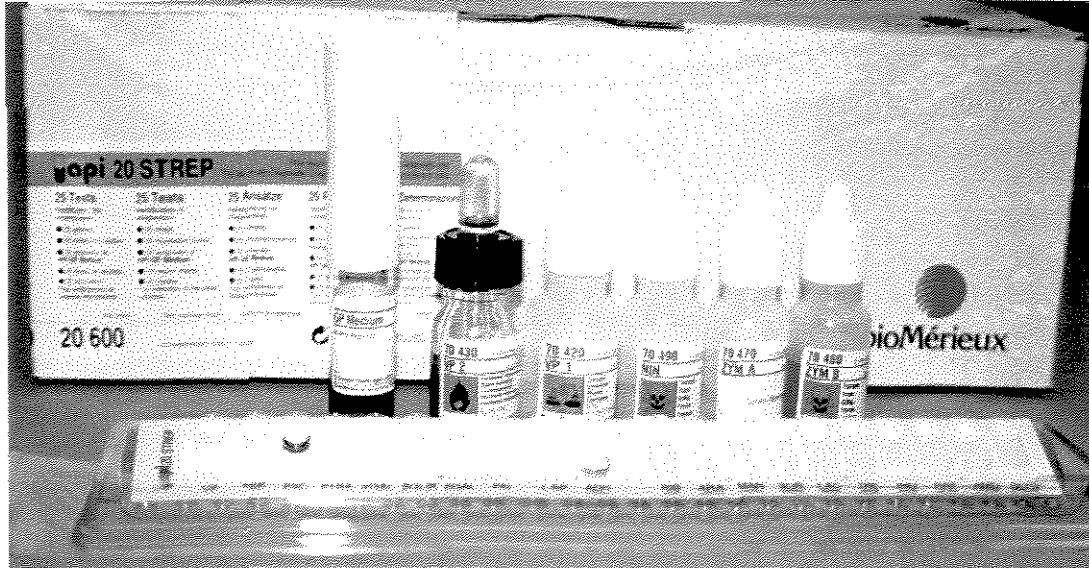
Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Strep com o inóculo bacteriano preparado até a metade da fita (até o teste da arginina-ADH). A seguir, abre uma ampola de “API GP Medium” e transfere o resto da suspensão para dentro dela, mistura bem, e preenche a segunda metade da fita (testes de ribose-RIB até glicogênio-GLYG). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); ZYM A e ZYM B no teste de PYRA até LAP, e NIN no teste HIP. Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 1.4. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Strep Analytical Profile Index”.

### 1.3. Quadro de interpretação do Api Strep

TESTS	SUBSTRATES	REACTIONS/ENZYMES	RESULTS			
			NEGATIVE		POSITIVE	
VP	Pyruvate	Acetoin production	VP 1 + VP 2 / wait 10 min (3)			
			Colorless		Pink-Red	
HIP	Hippurate	Hydrolysis	NIN / wait 10 min			
			Colorless/Pale blue		Dark blue/Violet	
ESC	Esculin	$\beta$ -glucosidase	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
			Colorless Pale yellow	Colorless Pale yellow Light grey	Black Grey	Black
PYRA	Pyrrolidonyl 2 naphthylamide	Pyrrolidonyl arylamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA to LAP) (1) if necessary, decolorize with intense light			
			Colorless or very pale orange		Orange	
$\alpha$ GAL	6-Bromo-2-naphthyl $\alpha$ -D-galactopyranoside	$\alpha$ -galactosidase	Colorless		Violet	
$\beta$ GUR	Naphthol AS-BI $\beta$ -D-glucuronate	$\beta$ -glucuronidase	Colorless		Blue	
$\beta$ GAL	2-naphthyl- $\beta$ -D- galactopyranoside	$\beta$ -galactosidase	Colorless or very pale violet		Violet	
PAL	2-naphthyl phosphate	Alkaline phosphatase	Colorless or very pale violet		Violet	
LAP	L-leucine-2-naphthylamide	Leucine arylamidase	Colorless		Orange	
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	Yellow		Red	
			4 hrs	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
<u>RIB</u>	Ribose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>ARA</u>	L-Arabinose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>MAN</u>	Mannitol	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>SOR</u>	Sorbitol	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>LAC</u>	Lactose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>TRE</u>	Trehalose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>INU</u>	Inulin	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>RAF</u>	Raffinose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>AMD</u>	Starch (2)	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
<u>GLYG</u>	Glycogen	Acidification	Red or Orange		Bright yellow	





Api 20 Strep

REF: \_\_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft / Origen / Prelevio: \_\_\_\_\_

bioMérieux

4h	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-		
24h	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
	VP	HIF	ESC	PYR	α-GAL	β-GAL	β-GAL	PAL	LAP	ADM	FB	ARA	MAN	SOR	LAC	TRE	INU	RAF	AMD	GLY	BHEM	
4h	7			1			4			3			7			1			1			
24h																						

Autres tests / Other tests / Webers Tests / Altri tests / Otros tests :

**COCOS GRAM + / CATALASE NEGATIVA**

Ident. : ***Enterococcus faecalis***

Figura V.1. Kit Api 20 Strep

## 2. Api Staph

### 2.1. Descrição

Api Staph (# 20 500) é um sistema de identificação dos gêneros *Staphylococcus* e *Micrococcus* utilizando testes bioquímicos padronizados. O sistema consiste de uma tira contendo substratos desidratados em microtubos individuais. Os testes são realizados adicionando a cada tubo uma alíquota do meio “Api Staph Medium” que foi inoculado com a amostra bacteriana a ser estudada. Cada Kit contém 25 tiras, recipientes para incubação, ampolas de “Api Staph Medium”, folhas de resultados e um manual do Kit. A identificação das amostras pode ser interpretada no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index” (bioMérieux, ref. 20 590).

### 2.2 Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Reagentes: VP 1, VP 2, NIT 1, NIT 2, ZYM A, ZYM B
- Padrão de McFarland
- Pipetas plásticas
- Swabs estéreis
- Óleo mineral
- Catálogo: Api Staph Analytical Profile Index

### 2.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C. a cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase positiva e aeróbios ou anaeróbios facultativos (Fig. V.2).

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Api Staph Medium” para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 0,5.

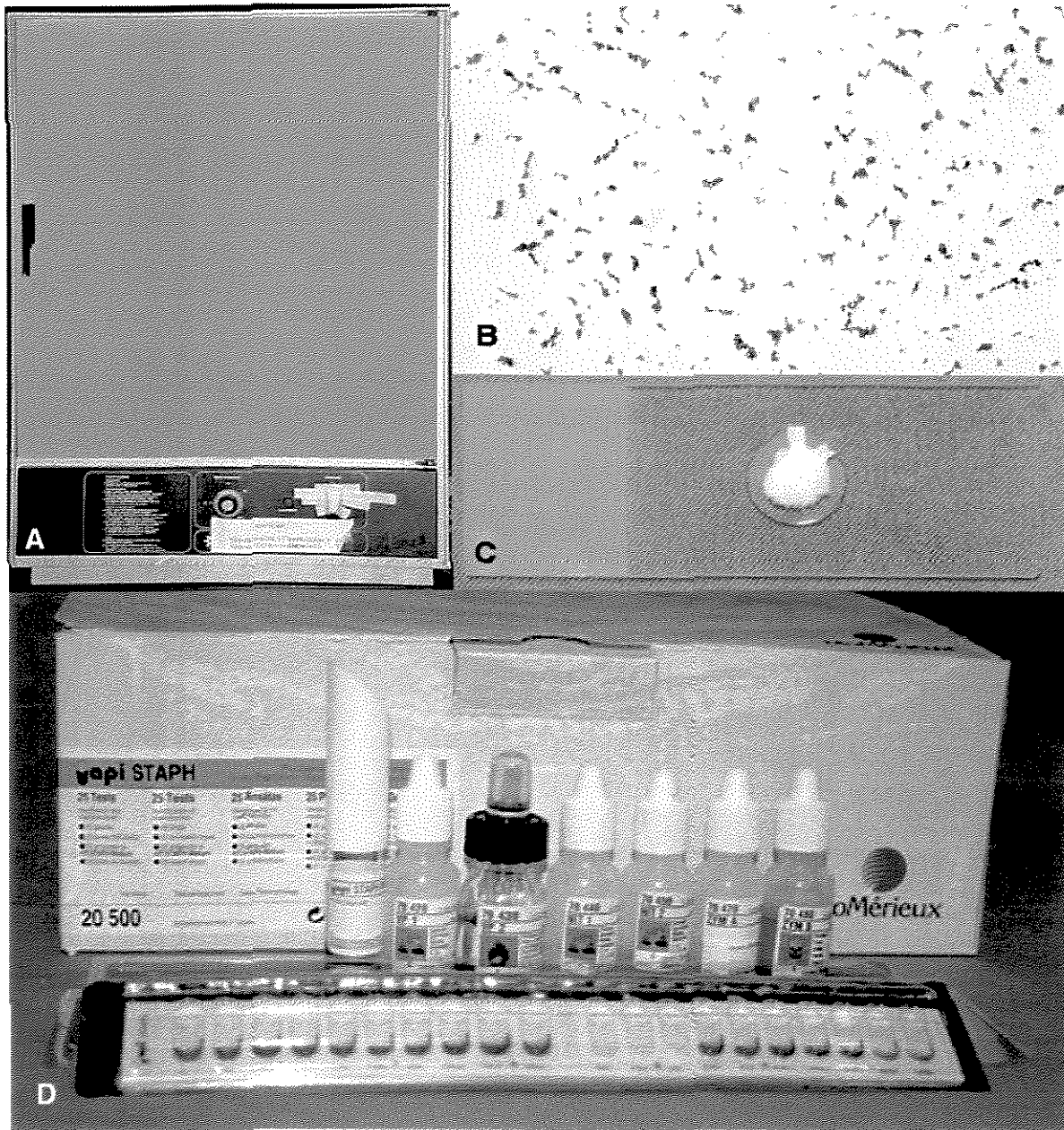
Cinco mL de água são colocados no recipiente de incubação para manter a umidade da atmosfera e a tira do Api Staph é colocada dentro da caixa.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do Api Staph com o inóculo bacteriano preparado no “Api Staph Medium”, evitando a formação de bolhas. Após preencher toda a tira, os tubos contendo os testes da arginina (ADH) e uréia (URE) são preenchidos com óleo mineral para promover anaerobiose. O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C por 18-24 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); NIT 1 e NIT 2 no teste do nitrato de potássio (NIT); e ZYM A e ZYM B no teste do ácido  $\beta$ -naftil fosfato (PAL). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 2.4. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Staph Analytical Profile Index”.

## 2.4. Quadro de interpretação do Api Staph

TESTS	SUBSTRATE	REACTIONS / ENZYMES	RESULT	
			NEGATIVE	POSITIVE
0	No substrate	Negative control	red	—
GLU	D-Glucose	(Positive control)  Acidification due to carbohydrate utilization	red	yellow
FRU	D-Fructose			
MNE	D-Mannose			
MAL	Maltose			
LAC	Lactose			
TRE	D-Trehalose			
MAN	D-Mannitol			
XLT	Xylitol			
MEL	D-Melibiose			
NIT	Potassium nitrate	Reduction of nitrate to nitrite	<u>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</u> colorless-light pink   red	
PAL	$\beta$ -naphthyl-acid phosphate	Alkaline phosphatase	<u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> yellow   violet	
VP	Sodium pyruvate	Acetyl-methyl-carbinol production	<u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u> colorless   violet-pink	
RAF	Raffinose	Acidification due to carbohydrate utilization	red	yellow
XYL	Xylose			
SAC	Sucrose			
MDG	$\alpha$ -methyl-D-glucoside			
NAG	N-acetyl-glucosamine			
ADH	Arginine	Arginine dihydrolase	yellow	orange-red
URE	Urea	Urease	yellow	red-violet



**Figura V.2.** A - Estufa de O<sub>2</sub>, B - Cocos Gram-positivas, C - Catalase positiva, D - Kit Api Staph

### 3. Rapid ID 32 A

#### 3.1. Descrição

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos estandardizados e em miniauturas. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas, 29 das quais são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index.”

#### 3.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

- Meio para suspensão: Suspension Medium, 2 ml
- Reagentes: JAMES, NIT 1, NIT 2, FB
- Padrão de McFarland
- Pipetas
- Swabs estéreis
- Óleo mineral
- Catálogo: Rapid ID 32 A Analytical Profile Index
- Placas de ágar-sangue com suplementos para o crescimento de bactérias anaeróbias.

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador
- Bico de Busen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

### 3.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas contendo Fastidious Anaerobe Agar mais sangue de carneiro desfibrinado por 24-48 horas a 37 °C anaerobicamente. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria no meio líquido “Suspension Medium” ou em água destilada estéril para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 4,0.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher as cúpulas com o inóculo bacteriano preparado no “Suspension Medium”. Duas gotas de óleo mineral são adicionadas a cúpula URE (1.0). O recipiente para incubação é tampado, e incubado a 37 °C anaerobicamente por 4 horas.

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes NIT 1 e NIT 2 no teste do NIT (cúpula 0.0) para verificar a redução de nitratos; JAMES no teste IND (cúpula 0.1) para verificar a produção de indol; e FB nos testes de PAL a SerA (cúpula 0.2 a 0.E). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item 3.4. Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index”.

### 3.4. Quadro de interpretação do Rapid ID 32 A

CUPULE	TEST	REACTION	RESULT	
			NEGATIVE	POSITIVE
1.0	<u>URE</u>	UREase	yellow	red
1.1	ADH	Arginine DiHydrolase		
1.2	$\alpha$ GAL	alpha GALactosidase	colorless	yellow
1.3	$\beta$ GAL	beta GALactosidase		
1.4	$\beta$ GP	beta Galactosidase 6 Phosphate		
1.5	$\alpha$ GLU	alpha GLUcosidase		
1.6	$\beta$ GLU	beta GLUcosidase		
1.7	$\alpha$ ARA	alpha ARABinosidase		
1.8	$\beta$ GUR	beta GlucURonidase		
1.9	$\beta$ NAG	beta N-Acetyl-Glucosaminidase		
1.A	MNE	MaNnosE fermentation	red	yellow-orange
1.B	RAF	RAFFinose fermentation		
1.C	GDC	Glutamic ac. DeCarboxylase	yellow-green	blue
1.D	$\alpha$ FUC	alpha FUCosidase	colorless	yellow
1.E		Empty cupules		
1.F				
0.0	NIT	Reduction of NITrates	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min - &lt; 10 min</u>	
			colorless	red
0.1	IND	INDole Production	<u>JAMES / 5 min - &lt; 10 min</u>	
			colorless	pink
0.2	PAL	Phosphatase ALcaline	<u>FB / 5 min - &lt; 10 min</u>	
			colorless	purple
0.3	ArgA	Arginine Arylamidase	<u>FB / 5 min - &lt; 10 min (ArgA → SerA)</u>	
0.4	ProA	Proline Arylamidase	colorless pale orange	orange
0.5	LGA	Leucyl Glycine Arylamidase		
0.6	PheA	Phenylalanine Arylamidase		
0.7	LeuA	Leucine Arylamidase		
0.8	PyrA	Pyroglutamic ac. Arylamidase		
0.9	TyrA	Tyrosine Arylamidase		
0.A	AlaA	Alanine Arylamidase		
0.B	GlyA	Glycine Arylamidase		
0.C	HisA	Histidine Arylamidase		
0.D	GGA	Glutamyl Glutamic ac. Arylamidase		
0.E	SerA	Serine Arylamidase		
0.F		Empty cupule		





#### 4. RapID ANA II

##### 4.1 Descrição:

O sistema RapID ANA II é um método miniaturizado empregado para identificação bioquímica de substratos cromogênicos e convencionais, neste caso, de bactérias anaeróbias clinicamente significantes.

Cada "kit" consiste de 20 recipientes para testes de RapID ANA II, bloco de anotações para os resultados, manual de instruções, manual de dados (RapID ANA II System Code Compendium) e 1 frasco de reagente RapID ANA II.

Cada recipiente de RapID ANA II contém 10 cavidades com reações (reações desidratadas) e proporciona 18 scores de teste. As cavidades de 3 a 10 são bifuncionais, contendo 2 testes diferentes na mesma cavidade. Teste bifuncional significa que o primeiro score é obtido sem adição do reagente, mostrando o primeiro resultado do teste. Na mesma cavidade é observado outro score com a adição do reagente fornecendo o resultado do segundo teste. A identificação é obtida após 4 horas de incubação.

O recipiente de teste RapID ANA II e reagentes devem ser estocados a 2-10° C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30° C, na embalagem original.

##### 4.2 Materiais:

a) 25 tubos fechados contendo em cada 1 mL de fluido de inoculação RapID (#25-102)

KCl.....7,5g

CaCl<sub>2</sub>.....0,5g

Água deionizada.....1000 mL

PH: 7,5-9,5.

b) 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Spot Indole (#30-9002).

c) 1 frasco contendo reagente suficiente para 20 recipientes de RapID ANA II Reagent

Ingredientes reativos:

3-fenil 4-metilaninoacrolein.....0,01 %

Ácido hidrocloreídrico.....0,1 %

Ácido acético.....1 %

Detergente.....0,1 %

d) Swabs estéreis

e) Pipetas estéreis.

f) Padrão McFarland: 3

g) Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado.

h) Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglaterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglaterra) ou Câmara de anaerobiose.

### 4.3 Procedimentos para identificação:

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37° C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado deve atingir no mínimo o equivalente ao padrão MacFarland 3 (uma suspensão com turbidez menor que o padrão MacFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são agitadas (se necessário) e usadas até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente deslocada para a inoculação bacteriana.

Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em posição horizontal em superfície plana. Este é gentilmente inclinado, de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores. Em seguida o recipiente é inclinado aproximadamente 45° C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática, observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado.

Ao adicionarmos os reagentes nas cavidades de teste específicas, obtém-se o segundo resultado, através da reação do reagente e observando-se a alteração de cor.

O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

#### 4.4 Quadro de interpretação do RapID ANA II

Cavity No.	Test Code	Reagent	Reaction	
			Positive	Negative
<b>BEFORE REAGENT ADDITION</b>				
1	URE	None	Red or Purple	Yellow to orange
2	BLTS			
3	aARA			
4	ONPG			
5	aGLU	None	Medium or bright yellow	Clear, tan or very pale yellow
6	BGLU			
7	aGAL			
8	aFUC			
9	NAG			
10	PO4			
<b>AFTER REAGENT ADDITION</b>				
3	LGY			
4	GLY			
5	PRO	RapID ANA II REAGENT	Purple, violet red or dark pink	Yellow, orange or pale pink
6	PAL			
7	ARG			
8	SER			
9	PYR			
10	IND	Innova Spot Indole Reagent	Blue or blue-green	Any other color



Innovative Diagnostic Systems • Norcross, GA Ref. No. \_\_\_\_\_



**Rapid ANA II System**

Date: \_\_\_\_\_

Tech: \_\_\_\_\_

Source: \_\_\_\_\_

Gram stain/Morphology: \_\_\_\_\_

Reagent	None										Rapid ANA II Reagent										SPOT control	
	Medium or bright yellow										Purple, violet, red or dark pink											
Positive Response?																					Blue or blue- green	
Colony #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
Test Code	USE	BLT	MAR	ORPS	ASUL	BGLU	ALAL	αLFD	NAC	PO1	CO	GLY	PHO	RAF	APIS	SER	PRG	IND				
Value	1	2	4	1	2	4	1	2	A	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4	
Result	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	
Value (pts)	0		2				2				3		0		4							

Microcode: \_\_\_\_\_  
 Identification: Prevotella intermedia

Figura V.4. Kit Rapid ANA II

## 5. RapID NH

### 5.1 Descrição:

O sistema RapID NH (# 1-1001), é um método miniaturizado qualitativo empregado para identificação de espécies clinicamente significantes de *Neisseria* e *Haemophilus*, *Eikenella* e *Actinobacillus*, através de substratos convencional e cromogênico.

Cada “kit” consiste de 20 recipientes para testes de RapID NH, blocos de anotações para os resultados e um manual de instruções.

O recipiente para teste do RapID NH contém 10 cavidades para reações (com enzimas desidratadas), que proporciona 12 “scores” para os testes, e se necessário, um décimo terceiro “score” de teste ( $\text{NO}_2$ ). As cavidades de teste 8, 9 e 10 são bifuncionais contendo 2 testes diferentes na mesma cavidade. O primeiro teste é obtido sem adição do reagente, fornecendo o primeiro resultado. Na mesma cavidade é adicionado o reagente que fornece o segundo resultado. Os testes bifuncionais são distintos e não necessariamente relatados.

Após 4 horas de incubação, as reações são obtidas através da leitura visual. Identificações são realizadas usando cada “score” de teste individual, em conjunto com as informações obtidas através da morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. O resultado padrão do “score” positivo e negativo é usado como base para identificação do teste isolado pela comparação dos resultados obtidos com o resultado padrão que é encontrado no manual de dados (RapID NH System Code Compendium).

O recipiente de teste RapID NH e reagentes devem ser estocados a 2-10° C. O fluido para inoculação RapID (RapID Inoculation Fluid), deve ser estocado a 15-30° C, na embalagem original.

## 5.2 Materiais:

- a) 25 tubos fechados contendo em cada 1 mL de fluido de inoculação RapID (#25-102)

KCl.....7,5g

CaCl<sub>2</sub>.....0,5g

Água deionizada.....1000 mL

PH: 7,5-9,5.

- b) 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Spot Indole (#30-9002).

- c) 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent A (#30-9003).

- d) 1 frasco contendo 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent B (#30-9004).

- e) Swabs estéreis.

- f) Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado.



### 5.3 Procedimentos para identificação:

Os organismos são subcultivados em placas de agar (Columbia) com 5% de sangue de cavalo por 18-24 horas a 37°C. A pureza da cultura é primariamente checada pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Um swab de algodão estéril é usado para inocular as colônias bacterianas no RapID Inoculation Fluid, até obter-se uma suspensão leitosa com turbidez equivalente ao McFarland 3 (suspensões preparadas com turbidez inferior ao McFarland 3 podem comprometer o resultado do teste). A suspensão é agitada no Vortex, devendo ser utilizada dentro de 15 minutos.

A tampa da cartela é aberta para que seja feita a inoculação bacteriana. Uma pipeta estéril é usada para transferir todo o inóculo preparado (RapID Inoculation Fluid + bactérias) para a cartela que contém as enzimas reagentes. O inóculo é depositado na cúpula do canto superior direito. A cartela é fechada novamente e inclinada para o lado de forma que o inóculo seja distribuído uniformemente por todas as cúpulas. A cartela é em seguida inclinada cerca de 45° para o lado oposto fazendo com que a suspensão bacteriana escoe para as cavidades que contém as enzimas reagentes. Volta-se a cartela a sua posição horizontal. A cartela é então incubada em aerobiose a 37°C por 4 horas.

Após a incubação da cartela cada cavidade é examinada quanto à reação enzimática observando presença ou ausência de coloração, sendo este o primeiro resultado.

O segundo resultado é obtido após a adição dos reagentes.

O resultado obtido é comparado com o padrão, que é encontrado no manual de dados.

## 5.4 Quadro de interpretação do RapID NH

Cavity No.	Test Code	Reagent	REACTION		Comments
			Positive	Negative	
<b>BEFORE REAGENT ADDITION:</b>					
1 2 3	PRO GGT ONPG	None	Yellow	Clear or Tan	Any development of a YELLOW color should be scored POSITIVE.
4 5	GLU SUC	None	Yellow or yellow-orange	Red or orange	Only a YELLOW or yellow-orange color is POSITIVE. Red or dark orange is negative test.
6	EST	None	Yellow or yellow-orange	Red or orange	The development of a YELLOW or YELLOW-ORANGE color throughout the well should be scored POSITIVE. A red layer may form on the top of the well. Gently shake the panel to mix and score as outlined.
7	RES	None	Pink	Purple, blue or violet	ONLY the development of a significant PINK color is a POSITIVE test.
8	PO4	None	Yellow	Clear, tan, or very pale yellow	Only the development of a significant YELLOW color should be scored POSITIVE.
9	ORN	None	Red	Yellow or orange	Only the development of a RED color should be scored as POSITIVE.
10	URE	None	Red or reddish-violet	Yellow or light orange	Only the development of a RED color should be scored as POSITIVE.
<b>AFTER REAGENT ADDITION:</b>					
Allow at least 1 minute, but no more than 5 minutes for color development.			Prolonged standing of tests after reagent addition may lead to color development in negative test cavities.		
8	NO2	Nitrate A Reagent Nitrate B Reagent	Clear or straw	Red or pink	ANY development of a RED or PINK color is a NEGATIVE test.
9	NO3	Nitrate A Reagent Nitrate B Reagent	Red or orange	Yellow	ANY development of a RED or ORANGE color is a POSITIVE test.
10	IND	Spot Indole Reagent	Brown, black or darkening	Orange or red	ANY development of a BROWN or BLACK is a POSITIVE test.



Figura V.5. Kit RapID NH

ANEXO VI - Aspectos clínicos, radiográficos e achados microbiológicos de 30 dentes com tratamento endodôntico prévio

Caso no.	Dente	Sexo	Rest.	D	DP	DAP	Ed	LP	S/M	Exs	Fist	Mob	Lim. Obt. (mm)	Qual. Obt.	Bactérias
1	22	F	NR	N	N	N	N	S	S	-	N	N	3-5	B	<i>S. sanguis</i>
2	41	M	RP	N	N	N	N	S	S	-	N	N	3-5	R	<i>S. sanguis</i>
3	32	M	RP	N	N	N	N	S	S	-	N	N	0-2	B	-
4	12	F	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	0-2	R	<i>S. salivarius</i>
5	22	F	RP	N	N	N	N	S	M	P	S	N	0-2	R	<i>S. mitis, E. faecalis, A. naeslundii</i>
6	15	F	RD	S	S	S	N	S	M	H	N	N	3-5	B	<i>P. micros, P. prevotii</i>
7	14	M	RP	N	N	N	N	S	S	-	N	N	0-2	B	-
8	11	F	NR	S	S	S	N	S	S	-	N	S	0-2	B	<i>P. saccharolyticus</i>
9	46	M	RD	N	N	N	N	S	M	H	N	N	0-2	R	<i>Propioni. acnes, E. faecalis</i>
10	22	F	RP	N	N	N	N	S	S	-	N	N	3-5	B	-

Rest = Restauração; NR = Não-restaurado; RD = Restauração definitiva; RP = Restauração provisória; D = Dor; DP = Dor prévia; DAP = Dor à percussão; Ed = edema; LP = Lesão periapical, S/M = S (seco) ou M (molhado); Exs = exsudato, P = purulento, H = hemorrágico, C = claro; Mob = Mobilidade; Lim. Obt. = limite apical da obturação em relação ao ápice; Qual. Obt. = qualidade da obturação; B = boa; R = ruim.

Aspectos clínicos e achados microbiológicos de 30 dentes com tratamento endodôntico prévio (continuação)

Caso no.	Dente	Sexo	Rest	D	DP	DAP	Ed	LP	S/M	Exs	Fist	Mob	Lim. Obt. (mm)	Qual. Obt.	Bacterias
11	45	M	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	3-5	R	-
12	11	F	RD	N	N	N	N	S	N	-	N	N	3-5	R	<i>P. buccae</i> , <i>P. micros</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>E. faecalis</i>
13	21	F	NR	S	S	S	N	S	M	H	N	N	3-5	R	<i>P. intermedia</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. corporis</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>P. prevotii</i> , <i>P. magnus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i>
14	45	F	NR	S	S	S	N	S	M	P	N	S	0-2	B	<i>Veillonella</i> spp, <i>S. mutans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Candida</i> spp.
15	31	M	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	0-2	B	-
16	22	F	RD	N	N	S	N	S	S	-	N	N	0-2	R	<i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>G. morbillorum</i>
17	44	F	RD	S	S	S	S	S	S	-	N	S	0-2	B	-
18	13	M	RD	N	S	S	N	S	S	-	N	N	3-5	B	<i>E. faecalis</i>
19	46	M	NR	N	S	N	N	S	M	H	N	N	>5	R	<i>P. buccae</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>A. naeslundii</i>
20	12	F	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	0-2	R	<i>E. faecalis</i>

Rest = Restauração; NR = Não-restaurado; RD = Restauração definitiva; RP = Restauração provisória D = Dor; DP = Dor prévia; DAP = Dor à percussão; Ed = edema; LP = Lesão periapical, S/M = S (seco) ou M (molhado); Exs = exsudato, P = purulento, H = hemorrágico, C = claro; Mob = Mobilidade; Lim. Obt.= limite apical da obturação em relação ao ápice; Qual. Obt.= qualidade da obturação; B = boa; R = ruim.

Aspectos clínicos e achados microbiológicos de 30 dentes com tratamento endodôntico prévio (continuação)

Caso no.	Dente	Sexo	Rest	D	DP	DAP	Ed	LP	S/M	Exs	Fist	Mob	Lim. Obt. (mm)	Qual. Obt.	Bactérias
21	12	M	RD	N	S	N	N	S	S	-	S	N	0-2	R	<i>Fusobacterium</i> ssp, <i>S. oralis</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>G. morbillorum</i>
22	12	M	RP	N	N	S	N	S	S	-	N	N	0-2	R	<i>Veillonella</i> ssp, <i>P. prevotii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>H. aphrophilus</i>
23	37	F	RD	N	N	S	N	S	S	-	N	N	0-2	B	<i>E. faecalis</i>
24	32	F	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	>5	R	<i>P. prevotii</i>
25	22	F	RD	N	S	S	N	S	S	-	N	N	0-2	B	<i>E. faecalis</i>
26	12	M	RD	N	S	S	N	S	S	-	S	N	3-5	R	<i>P. prevotii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. sanguis</i>
27	21	M	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	3-5	R	<i>E. faecalis</i>
28	15	M	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	3-5	B	<i>S. constellatus</i>
29	11	M	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	0-2	R	<i>E. faecalis</i>
30	22	M	RD	N	N	N	N	S	S	-	N	N	0-2	B	<i>S. aureus</i>

Rest = Restauração; NR = Não-restaurado; RD = Restauração definitiva; RP = Restauração provisória D = Dor; DP = Dor prévia; DAP = Dor à percussão; Ed = edema; LP = Lesão periapical, S/M = S (seco) ou M (molhado); Exs = exsudato, P = purulento, H = hemorrágico, C = claro; Mob = Mobilidade; Lim. Obt.= limite apical da obturação em relação ao ápice; Qual. Obt.= qualidade da obturação; B = boa; R = ruim.