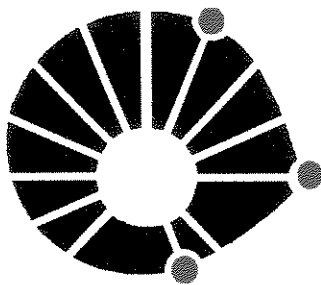


FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



UNICAMP

EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA

Cirurgiã-dentista

**ESTUDO BACTERIOLÓGICO DE CANAIS
RADICULARES ASSOCIADOS A
ABSCESSOS PERIAPICAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, Área de Endodontia.

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE
PIRACICABA
2000**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA

Cirurgiã-dentista

**ESTUDO BACTERIOLÓGICO DE CANAIS
RADICULARES ASSOCIADOS A
ABSCESSOS PERIAPICAIS**

Orientador: PROF. DR. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

Dissertação apresentada ao Curso de Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, Área de Endodontia.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Clóvis Monteiro Bramante

Profa. Dra. Brenda Paula F. de A. Gomes

Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CPG, 02/03/01
Assinatura do Orientador

**PIRACICABA
2000**

200107134



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 11 de Dezembro de 2000, considerou a candidata EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA aprovada.

1. Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "Caio Ferraz", written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. CLOVIS MONTEIRO BRAMANTE

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "Clovis Bramante", written over a horizontal line.

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

A handwritten signature in dark ink, appearing to be "Brenda Gomes", written over a horizontal line.

“O guerreiro contempla as duas colunas que estão ao lado da porta que pretende abrir.

Uma se chama Medo, outra se chama Desejo. O guerreiro olha para a coluna do medo, e ali está escrito: “você vai entrar num mundo desconhecido e perigoso, onde tudo que aprendeu até agora não servirá para nada”.

O guerreiro olha para a coluna do Desejo, e ali está escrito: “você vai sair de um mundo conhecido, onde estão guardadas as coisas que sempre quis, e pelas quais lutou tanto”.

O guerreiro sorri – porque não existe nada que o assuste, e nada que o prenda. Com a segurança de quem sabe o que quer, ele abre a porta.”

*Aos meus pais, **ROLIM** e **LEONI**, exemplos de honestidade e luta, pela compreensão e sabedoria transmitidas ao longo de minha vida;*

*Aos meus avós maternos, **MANOEL** e **LEONOR**, pelo carinho e dedicação, tornando possível a realização deste sonho;*

*Aos meus avós paternos, **AUGUSTO** e **EZEQUIELA** (in memoriam), por fazerem parte da minha vida;*

**Dedico este trabalho
com amor.**

*Ao Fernando, pelo amor, companheirismo, paciência e
inspiração;*

*Aos meus irmãos, Erick e Evandro, por todos os momentos
felizes já vividos;*

**Dedico, de maneira especial,
este trabalho**

Agradeço

à ***DEUS,***

por iluminar o meu caminho.

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Caio
Cezar Randi Ferraz, pela participação
ativa e direta neste grande passo da
minha vida científica, pelos exemplos,
competência e dedicação profissional,
meu eterno agradecimento.*

*À Profa. Dra. Brenda Gomes, pela
oportunidade de compartilhar seus
conhecimentos em Microbiologia
Endodôntica, transmitindo preciosos
ensinamentos fundamentais para o
desenvolvimento deste trabalho. Meu
respeito, admiração e reconhecimento.*

Ao Prof. Dr. Luiz Valdrighi, cuja serenidade, capacidade, habilidade e conhecimentos em Endodontia são exemplos a serem seguidos, e pelo carinho com que sempre me atendeu. Muito Obrigada.

*Ao Prof. Dr. Clóvis Monteiro
Bramante da Faculdade de Odontologia
de Bauru - USP, por acreditar em mim e
incentivar a continuidade do meu
engrandecimento científico, meu eterno
agradecimento.*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas , na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Antonio 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, pela dedicação e atenção dispensada sempre que solicitada;

À **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, coordenadora do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, pelo apoio recebido;

Ao **Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho**, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pela confiança e exemplo;

Ao **Prof. Dr. Alexandre Zaia**, **Prof. Dr. Fabrício Teixeira**, professores da disciplina de Endodontia da FOP, pelo estímulo e atenção dispensada sempre que solicitados;

Aos **Professores das áreas de Farmacologia e Microbiologia** da FOP/UNICAMP, pelo apoio e confiança;

Aos estimados amigos de Mestrado em Endodontia, **Ronaldo Rodrigues, Noboru Imura, Cícero Gadê-Neto, Ericka Pinheiro, Eneida Santos de Araújo e Assis Pedroso** pelo companheirismo e colaboração inestimável;

Ao amigo de Pós-graduação da Endodontia **João Eduardo Gomes Filho**, pelo incansável auxílio, apoio, companheirismo e por ser essa pessoa tão especial e iluminada;

Às amigas do Maranhão do curso de Mestrado Interinstitucional em Clínica Odontológica FOP/UNICAMP, **Tétis Sauáia e Soraia Carvalho**, pela amizade e carinho;

Às amigas do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica FOP/UNICAMP, **Viviane Maia Oliveira e Liliana Torres**, pelo carinho e incentivo nos momentos difíceis;

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

Aos alunos da graduação, especialmente, **Tatiana Normanha, Vanessa Berber** e a todos que me ajudaram de alguma forma;

Aos funcionários da Disciplina de Endodontia Denize L. de Pinho, Maria Aparecida Buscariol, Rubens M. Payão, Adailton dos S. Lima e Maria Aparecida Riva, pela convivência e pelo auxílio em meus trabalhos diários;

Às estagiárias do laboratório de Microbiologia da área de Endodontia, Kéli Cristina de Carvalho, Patrícia Maria Maccagnanp e Morgana Eli Vianna, pela amizade e carinho;

Aos Pacientes, meu agradecimento especial, pois possibilitaram a realização deste trabalho;

À FAPESP pelo apoio financeiro, possibilitando o desenvolvimento deste trabalho;

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

SUMÁRIO

CAPÍTULO	PÁGINA
LISTA DE FIGURAS.....	01
LISTA DE TABELAS.....	07
RESUMO.....	09
ABSTRACT.....	11
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
PROPOSIÇÃO.....	55
MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
RESULTADOS.....	79
DISCUSSÃO.....	91
CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
ANEXOS.....	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Critérios clínicos para diferenciar a localização dos abscessos periapicais.....	59
Figura 2. Cilindro de nitrogênio.....	61
Figura 3A. Coleta do Canal Radicular.....	64
Figura 3B. Meio de Transporte VMGAIII.....	64
Figura 3C. Agitador de Tubo.....	64
Figura 3D. Diluição	64
Figura 3E. Inoculação.....	64
Figura 3F. Incubação na Câmara de Anaerobiose.....	64
Figura 4A. Primeira Cultura.....	68
Figura 4B. Cultura Pura.....	68
Figura 4C. Câmara de Anaerobiose.....	68
Figura 4D. Estufa de Cultura microbiológica.....	68
Figura 4E. Morfologia Microscópica.....	68
Figura 4F. Teste de Catalase.....	68
Figura 4G. Ficha do kit de identificação.....	68
Figura 4H. Aparelho de Fluorescência sob luz UV.....	68
Figura 4I. Fluorescência sob luz UV.....	68

Figura 5A. Fita de E-Test (frente).....	72
Figura 5B. Esquema do gradiente exponencial do antibiótico (verso da fita).....	72
Figura 6A. Cultura Pura.....	76
Figura 6B. Preparo do inóculo bacteriano.....	76
Figura 6C. Agitação do inóculo.....	76
Figura 6D. verificação da turbidez do meio no espectrofotômetro.....	76
Figura 6E. Inoculação.....	76
Figura 6F. Placa com E-test.....	76
Figura 6G. Fita do E-test.....	76
Figura 6H. Embalagem da fita do E-test.....	76
Figura 7A. Placa mostrando halo de inibição.....	77
Figura 7B. Aumento da figura 7A	77
Figura 8. Esquema representativo contendo número total de canais radiculares investigados com e sem crescimento bacteriano, número total de microrganismos isolados e média de bactérias por canal radicular.....	79

Figura 9. Representação gráfica da freqüência de bactéria anaeróbia, facultativa, Gram-positiva e Gram-negativa.....	85
Figura 10. Representação gráfica das espécies bacterianas prevalentes (%).....	86
Figura 11. Gráfico representativo da freqüência dos abscessos periapicais quanto a localização (n=30).....	87
Figura 12. Certificado do Comitê de Ética.....	137
Figura 13. Frasco contendo ágar para anaeróbios exigentes FAA – Fastidious Anaerobe Agar (meio sólido).....	142
Figura 14. Embalagem do suplemento seletivo para bactérias Gram-negativas.....	147
Figura 15. Frasco contendo ágar para anaeróbios exigentes FAB – “Fastidious Anaerobe Broth” (meio em caldo)	151
Figura 16. Frasco contendo meio de cultura ágar Brucella (utilizado no teste de suscetibilidade – <i>E-test</i>)	155
Figura 17. Ilustração representativa dos procedimentos para identificação do “kit” de identificação Rapid ID 32A.....	163

Figura 18. Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação Rapid ID 32A.....	164
Figura 19. Embalagem do “kit” de identificação Rapid ID 32A e reagentes utilizados	165
Figura 20A. Ilustração representativa dos procedimentos para identificação do “kit” de identificação Rapid ANA II.....	171
Figura 20B. Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação Rapid ANA II.....	171
Figura 21. Embalagem do “kit” de identificação Rapid ANA II e reagentes utilizados	172
Figura 22. Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação Rapid NH.....	179
Figura 23. Embalagem do “kit” de identificação Rapid NH e reagentes utilizados.....	180
Figura 24. Ilustração representativa dos procedimentos para identificação do “kit” de identificação Api 20 <i>Strep</i>	185

Figura 25. Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação <i>Api 20 Strep</i>	186
Figura 26. Embalagem do “kit” de identificação <i>API 20 Strep</i> e reagentes utilizados.....	187
Figura 27. Ilustração representativa dos procedimentos para identificação do “kit” de identificação <i>Api Staph</i>	192
Figura 28. Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação <i>Api Staph</i>	193
Figura 29. Embalagem do “kit “ de identificação <i>API Staph</i> e reagentes utilizados.....	194
Figura 30. Ficha resumo dos aspectos clínicos e radiográficos de 30 pacientes com canais radiculares associados a abscessos periapicais.....	195
Figura 31. Ficha resumo dos achados microbiológicos de 30 pacientes com canais radiculares associados a abscessos periapicais.....	196

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Bactérias comumente isoladas de polpas necróticas infectadas.....	25
TABELA 2. Bactérias comumente isoladas de abscessos periapicais.....	37
TABELA 3. Frequência de microrganismos anaeróbios estritos e facultativos isolados de 30 canais radiculares associados a abscessos periapicais.....	75
TABELA 4. Frequência de microrganismos gram-positivos e gram-negativos isolados.....	80
TABELA 5. Frequência de canais radiculares investigados apresentando microrganismos anaeróbios e facultativos (n=30).....	80
TABELA 6. Frequência de canais radiculares investigados apresentando microrganismos gram-positivo e gram-negativo (n=30).....	81
TABELA 7. Frequência de todos os microrganismos encontrados nos canais radiculares investigados, exigência gasosa e coloração de Gram.....	81

TABELA 8. Classificação dos Abscessos Periapicais quanto a localização e frequência (n=30).....	82
---	----

TABELA 9. Valores interpretativos das CIMs dos antimicrobianos avaliados nos testes de bactérias anaeróbias estritas (NCCLS).....	83
---	----

TABELA 10. Valores das CIMs dos antibióticos testados frente as espécies <i>Peptostreptococcus prevotii</i> e <i>Fusobacterium necrophorum</i>	89
--	----

TABELA 11. Suscetibilidade antimicrobiana das espécies testadas, baseadas nos valores interpretativos da NCCLS.....	89
---	----

RESUMO

Canais radiculares infectados tipicamente abrigam uma microbiota mista, composta principalmente por espécies anaeróbias. O papel das bactérias e seus subprodutos no desenvolvimento e perpetuação das infecções endodônticas já está bem estabelecido. Pesquisas têm sido realizadas para correlacionar a presença de bactérias em canais radiculares infectados com sinais e sintomas clínicos. A proposta do presente estudo foi investigar a composição da microbiota de canais radiculares infectados, associados a abscessos periapicais, e a possível correlação entre espécies bacterianas específicas com as fases dos abscessos, além de realizar testes de sensibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas. As amostras microbiológicas foram coletadas de 30 canais radiculares usando pontas de papel estéreis, transportadas em VMGA, diluídas, plaqueadas e incubadas em câmara de anaerobiose. Colônias microbianas foram isoladas, caracterizadas e identificadas por métodos padronizados. Cento e dezessete bactérias foram encontradas, sendo 75 (64,1%) anaeróbias estritas. Uma ou mais (máximo de 10) espécies bacterianas foram encontradas em 29 (96,6%) canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais, confirmando a característica polimicrobiana das infecções endodônticas. As bactérias anaeróbias mais frequentemente isoladas foram: *Peptostreptococcus prevotii* (43,3%), *Peptostreptococcus micros* (30%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%). Embora menos frequentes, bactérias facultativas como *Gemella morbillorum* (30%) e *Streptococcus mitis* (20%) também foram encontradas. Contudo, a análise estatística não encontrou relação entre presença dos abscessos periapicais com qualquer das espécies bacterianas identificadas ($p>0,05$). As espécies mais prevalentes *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* foram testadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana através do método do *E-test*, utilizando os seguintes antibióticos: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina. *Ps. prevotii* e *F. necrophorum* apresentaram-se sensíveis a todos os antibióticos testados. Apesar da ausência de significância estatística, nossos resultados indicaram predominância de bactérias anaeróbias Gram-positivas e a presença de microbiota mista nos canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana revelaram a presença de sensibilidade bacteriana entre as espécies *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina.

Palavras-Chave: Abscessos Periapicais; Bactérias; Canal Radicular; suscetibilidade antimicrobiana.

ABSTRACT

BACTERIOLOGICAL STUDY OF ROOTS CANALS ASSOCIATED TO PERIAPICAL ABSCESSSES

Infected dental root canals typically harbour a mixed flora, including many anaerobic species. The role of these microorganisms and their by-products in the development and perpetuation of pulp and periapical diseases has already been well established. Efforts have been made in order to correlate bacteria present in infected dental root canals to clinical signs and symptoms. The present study was outlined to identify microorganisms present in root canals associated to periapical abscesses, the correlation specific bacteria species with the phases of this inflammatory acute process, signs and symptoms and, to test the susceptibility of this microbiota to antibiotics. Microbiological samples were collected from 30 root canals using sterile paper points, transported in VMGA and diluted, plated and incubated in an anaerobic chamber. Microbial colonies were then purified, characterised and identified by established methods. One hundred seven different bacterial species were recovered, being 75 (64.1%) strict anaerobes or microphilic species. One or more (maximum of 10) bacterial species were recovered from 29 (96.6%) root canals, showing the polymicrobial characteristic of dental infections. The anaerobes most frequently isolated were: *Peptostreptococcus prevotii* (43.3%), *Peptostreptococcus micros* (30%), *Fusobacterium necrophorum* (23.3%). Although less frequent, facultative bacteria as *Gemella morbillorum* (30%) e *Streptococcus mitis* (20%) were also found. However, statistical analysis by a Pearson X^2 test or a one-sided Fisher's exact test did not find statistical relationship between any bacterial specie identified and the presence of periapical abscesses ($p>0.05$). Antibiotic sensitivity of *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* was accomplished with the *E-test* System. These bacterial isolates were tested for their susceptibility/resistance to benzylpenicilin, amoxiciln, amoxicilin combined with clavulanate and clindamycin. The species *Peptostreptococcus prevotii* and *Fusobacterium necrophorum* were susceptible to all tested antibiotics. In spite of the lack of statistical significance, our results indicated predominance of Gram-positive anaerobic bacteria at the mixed microflora present in dental root canals associated with periapical abscesses. Antibiotic susceptibility data showed *Peptostreptococcus prevotii* and *Fusobacterium necrophorum* susceptibility to all tested antibiotics.

KEY-WORDS: Periapical Abscess; Bacteria; Root Canals; Antibiotic Susceptibility

INTRODUÇÃO

O tratamento dos canais radiculares tem como um dos objetivos principais remover bactérias, subprodutos bacterianos e substratos, utilizando métodos químico-mecânicos adequados que consigam romper e destruir o ecossistema microbiano, caso contrário, a infecção pode se estender até os tecidos periapicais, causando alterações nesta região.

Dentre as alterações periapicais encontram-se os abscessos periapicais, que são reações inflamatórias agudas, caracterizadas por coleções purulentas localizadas, estando implícito o caráter agudo de sua ocorrência do ponto de vista microscópico; havendo presença abundante de neutrófilos, amplas áreas de destruição tecidual e fenômenos vasculares exsudativos (**CONSOLARO & RIBEIRO, 1998**).

O conhecimento da microbiota bacteriana associada aos abscessos periapicais é importante no desenvolvimento e entendimento deste processo patológico, bem como, seu comportamento frente a diversos antimicrobianos, podendo portanto, colaborar no desenvolvimento da prática endodôntica.

REVISÃO DE LITERATURA

MICROBIOLOGIA E A ENDODONTIA

Existe uma estreita relação entre Microbiologia e Endodontia, pois microrganismos estão envolvidos nas doenças pulpare e periapicais. Sendo assim, a terapia endodôntica é essencialmente um procedimento de debridamento e descontaminação. O conhecimento da microbiota endodôntica é crucial para o sucesso do tratamento dos canais radiculares (WEINE, 1989).

Em 1894, **MILLER** relatou a associação entre bactérias e as alterações pulpare e perirradiculares após análise de amostras microbiológicas coletadas de canais radiculares, identificando grande variedade de células bacterianas, compreendendo os três tipos morfológicos conhecidos: cocos, bacilos e espirilos.

ONDERDONK (1901) foi o primeiro a sugerir a realização de culturas microbiológica dos canais radiculares para determinar a presença de bactérias, relacionando esta situação com o sucesso endodôntico.

COOLIDGE (1919) defendeu que a cultura microbiológica deveria ser adaptada como procedimento de rotina clínica na terapia endodôntica. Assim, o sucesso do tratamento endodôntico dependeria da esterilidade do canal radicular, confirmado pela cultura bacteriana antes da obturação. Com o passar dos tempos

foram surgindo opiniões contrárias à necessidade de se fazer esse procedimento para se obter o sucesso endodôntico (**BENDER et al., 1964; MORSE, 1971**). O interesse na microbiota do canal radicular se renovou especialmente após o isolamento de bactérias anaeróbias estritas de pigmento preto da polpa dental, e a associação destes microrganismos com aspectos clínicos (**SUNDQVIST, 1976; YOSHIDA et al., 1987; GOMES, 1995**). Estes estudos mostram que a cultura microbiológica tem seu lugar na Endodontia atual. A lesão periapical persistente, canal úmido, dor, entre outros, podem ser indicadores para a cultura de canais radiculares, tanto no diagnóstico quanto na escolha do antimicrobiano a ser empregado (**MORSE, 1970**).

Até a metade dos anos 70, acreditava-se que a doença periapical era causada principalmente por bactérias anaeróbias facultativas. Todavia, com o advento dos métodos para cultura microbiológica estritamente anaeróbia, tornou-se evidente que a doença periapical é polimicrobiana, dominada por bactérias anaeróbias. Assim, constantes melhorias nas técnicas microbiológicas, especialmente facilitando o estudo de anaeróbios estritos, têm aumentado o conhecimento sobre bactérias específicas nas doenças pulpares e periapicais. Além disso, recentes avanços nos métodos de cultura e identificação bacteriana têm feito com que a microbiologia endodôntica esteja mais acessível.

KANTZ & HENRY (1974) introduziram a técnica para cultura anaeróbia, utilizando para isso o meio de transporte “Reduced Transport Fastidious” (RTF). Na coleta microbiana colocaram o RTF no interior do canal radicular, e em

seguida realizaram a coleta com pontas de papel absorvente, possibilitando a identificação de anaeróbios nos tecidos pulpare e periapicais. A respeito disso, o surgimento de “kits” comerciais para a identificação de microrganismos, inclusive anaeróbios estritos, tem permitido análises rápidas, seguras e economicamente viáveis. Os “kits” de identificação são baseados em testes bioquímicos distintos através de reações enzimáticas. A interpretação dos resultados dos testes enzimáticos não é complicada, devido as várias reações que ocorrem no complexo meio de cultura contendo o substrato (**VAN WINKELHOFF et al., 1988**). Além do mais, segundo **GOMES et al., 1994b** os “kits” comerciais também evitam muitos problemas que podem ocorrer pelas variações interlaboratoriais, por exemplo os reagentes utilizados.

ROTAS DE ACESSO DOS MICRORGANISMOS NOS CANAIS RADICULARES

A condição pulpar é fator importante na suscetibilidade à invasão microbiana. Polpas vivas são mais resistentes a invasão microbiana, podendo dificultar e até impedir a penetração de microrganismos. Já, polpas necróticas são rapidamente invadidas e colonizadas por bactérias pois, a falta de circulação sangüínea, compromete os mecanismos de defesa do hospedeiro, e os produtos da degradação pulpar servem como nutrientes essenciais à sobrevivência de microrganismos (CVEK, 1978). Da mesma forma, TAKAHASHI (1998) considera os canais radiculares, com polpa necrótica, ambiente favorável à colonização e proliferação bacteriana, devido a ausência de circulação sangüínea e a possibilidade de estagnação e degradação de componentes protéicos dos fluidos tissulares. Estes podem transformar-se em substratos necessários para a sobrevivência de microrganismos, desencadeando reações de defesa no hospedeiro, caracterizadas pelo desenvolvimento de lesão periapical.

A invasão microbiana até a cavidade pulpar pode seguir vários caminhos, dentre eles: cárie dental, túbulos dentinários expostos, exposição pulpar direta, procedimentos restauradores, canais laterais de dentes com comprometimento periodontal, e através da corrente sangüínea, denominada via anacorética (BERGENHOLTZ, 1981). A via mais comum de contaminação é a cárie dental, induzindo sucessivas respostas inflamatórias no tecido pulpar, terminando com a necrose da polpa, caso não sejam adotadas medidas terapêuticas (SUNDQVIST, 1992a).

Teoricamente, a comunicação entre a polpa e o ligamento periodontal ocorre através de foraminas, deltas apicais, canais laterais, acessórios, e interradiculares e, os túbulos dentinários (**DONGARI & LAMBRIANIDIS, 1988**). Embora uma relação de causa e efeito exista entre infecção do canal radicular e lesões laterais ou periapicais, a penetração de bactérias em direção à polpa durante a doença periodontal é um tema de controvérsias e investigações (**TORABINEJAD & KIGER, 1985**). Outros exemplos desta comunicação pode ocorrer através de reabsorção radicular externa, fraturas, procedimentos iatrogênicos, entre outros (**GOMES, 1995**).

De acordo com **CSERNYEI (1939)** a contaminação pulpar pode ocorrer por via anacorética, pois bactérias presentes na corrente sangüínea têm a capacidade de localizar e colonizar áreas de polpa inflamada de dentes traumatizados mesmo não havendo exposição pulpar à cavidade oral. Se a resistência do hospedeiro não for suficientemente competente para erradicá-las, estas bactérias e seus produtos tóxicos persistem e induzem um processo inflamatório destrutivo.

Segundo **WHITE (1976)** existe também a hipótese de que bactérias de dentes adjacentes podem invadir a polpa de dentes saudáveis via forame apical, causando inflamação ou mesmo a necrose da polpa. **SUNDQVIST (1976)** investigando amostras microbiológica de 32 dentes traumatizados com polpa necrótica e coroas intactas, verificou a prevalência de 90% de anaeróbios estritos do total das cepas isoladas.

KAKEHASHI et al. (1965) expuseram polpas vitais de dentes de ratos *germ-free* e convencionais, ao meio bucal. Nos ratos convencionais observaram a necrose da polpa, seguida de inflamação e formação de lesão periapical. Quando os mesmos procedimentos foram realizados em ratos *germ-free*, as polpas permaneceram vitais com mínima inflamação, além das cavidades preparadas com brocas terem sido reparadas com formação de pontes de dentina. O estudo demonstrou que sem a presença de bactérias e seus produtos, as lesões periapicais de origem endodôntica não ocorrem. A confirmação veio com o estudo feito por **MOLLER et al. (1981)** em nove macacos, no qual se observou que polpas necróticas sem infecção não induziam reações inflamatórias ou formação de lesões periapicais. Todavia, se o tecido pulpar fosse infectado, ocorria a formação de lesões periapicais e inflamação nos tecidos apicais. Esses achados foram confirmados posteriormente por **BYSTRÖM & SUNDQVIST (1983)** e **BAUMGARTNER & FALKLER (1991)**, constatando a prevalência de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares infectados, inclusive nos 5,0 mm apicais.

Além do mais, **KORZEN et al. (1974)** demonstraram que infecções mistas desencadeiam processos patológicos periapicais mais complexos, e não monoinfecções. **FABRICIUS et al. (1982)** confirmam este parecer ao inocularem cepas bacterianas isoladas e em várias combinações no interior de canais radiculares de macacos. As bactérias inoculadas isoladamente, mostraram formação de lesões periapicais discretas, já quando inoculadas em associações, originaram reações periapicais mais severas. Portanto, a doença periapical é o resultado da presença de bactérias, seus produtos e a resposta do hospedeiro.

INTERAÇÕES BACTERIANAS

Sabe-se que as infecções endodônticas são geralmente mistas, com as espécies bacterianas possuindo virulência variável. O baixo teor de oxigênio na cavidade pulpar, os nutrientes disponíveis e as interações bacterianas são determinantes ecológicos da microbiota endodôntica (**SUNDQVIST, 1992 a, b**).

Microrganismos são freqüentemente classificados como anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos, de acordo com sua capacidade de crescimento na presença ou na ausência de oxigênio. Porém, uma taxa de tolerância para o oxigênio ocorre entre os anaeróbios estritos. Entretanto, os aeróbios estritos são raramente encontrados na cavidade oral. Além disso, existem alguns organismos que são capnofílicos (necessitam de CO₂) e outros que são microaerofílicos (aqueles que necessitam de baixa concentração de oxigênio para o crescimento) (**SUNDQVIST, 1992b; GOMES, 1995**).

A concentração de oxigênio é considerada o principal fator que limita o crescimento de anaeróbios estritos. Oxigênio é o mais comum e o mais disponível receptor de elétron na maioria dos ambientes microbianos e sua presença resulta na oxidação do *habitat*. Espécies anaeróbias necessitam de condições reduzidas para o seu metabolismo normal; além do mais, a quantidade de óxido-redução na área é que controla a sobrevivência dos anaeróbios (**GOMES, 1995**).

As interações entre as espécies bacterianas presentes nos canais

radiculares infectados podem ser positivas, quando uma espécie bacteriana utiliza como nutriente, subprodutos metabólicos de outra, por exemplo o crescimento de bactérias pigmentadas de preto é necessário a produção de vitamina K e hemina de outras bactérias (**GOMES, 1995**). Por outro lado, alguns subprodutos podem agir como toxinas, dependendo das espécies de bactérias que os produzem e de suas concentrações no ecossistema do canal radicular (**SUNDQVIST, 1992a; GOMES et al., 1994b**). Desta forma, as interações bacterianas também podem ter efeito negativo, inibindo o crescimento de certas espécies e aumentando as chances do hospedeiro reagir contra o agente infeccioso e restaurar a sua saúde (**GOMES, 1995**).

GRUPOS BACTERIANOS

As infecções endodônticas são polimicrobianas, embora mais de 100 espécies diferentes tenham sido isoladas de canais radiculares, a microbiota endodôntica é dominada por bactérias anaeróbias, das quais usualmente só estão presentes no canal radicular entre 1 a 12 espécies, sendo que o número de espécies bacterianas é maior em dentes com lesões periapicais (**SUNDQVIST, 1992a b; SUNDQVIST, 1994**).

Parece evidente que existem condições seletivas nos canais radiculares, provavelmente criadas pela necrose pulpar, que favorecem a infecção por bactérias anaeróbias em relação aos aeróbios. Estas condições são dependentes do teor de oxigênio e do desenvolvimento de um baixo potencial de óxido-redução, da disponibilidade de nutrientes e das interações bacterianas (**SUNDQVIST, 1992a b**). As bactérias anaeróbias facultativas, como os *Streptococcus spp.*, fazem parte desta microbiota, localizando-se principalmente, no terço coronário do canal radicular, em dentes com câmara pulpar exposta à cavidade oral por cáries. Já as bactérias aeróbias, podem estar presentes em menor frequência, contudo, podem ser introduzidas para o interior dos canais durante as diversas fases do tratamento endodôntico (**SUNDQVIST, 1994**).

Na microbiota do canal radicular infectado (**TABELA 1**), os gêneros bacterianos mais comumente isolados são os anaeróbios facultativos *Streptococcus* e os gêneros relacionados tais como *Enterococcus* e *Gemella*, e os

anaeróbios estritos como *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga*. Também têm sido encontrados menos freqüentemente os gêneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphylococcus*, *Mitsuokella* e *Wollinella*. Ocasionalmente é relatado a presença dos gêneros facultativos como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Campylobacter* e *Actinobacillus*. Mais raramente são isolados os facultativos *Hafnia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aerobacter* e *Alcaligenes*, e os aeróbios *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Mima*, *Pseudomonas*, e *Micrococcus*. *Hafnia* não é normalmente encontrada na boca, mas pode estar presente como um contaminante da água usada nas tubulações do equipo odontológico (MORSE, 1987; SUNDQVIST, 1994; GOMES, 1995).

TABELA 1 - Bactérias comumente isoladas de polpas necróticas infectadas.

(GOMES, 1995)

	GÊNERO	Espécies/Grupos comuns
Bactérias Anaeróbias Estritas		
Bastonetes Gram-negativos	<i>Porphyromonas</i>	<i>P. gingivalis</i> <i>P. endodontalis</i>
	<i>Prevotella</i>	<i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. oralis</i> <i>P. oris</i> <i>P. buccae</i>
	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i> <i>F. necrophorum</i>
	<i>Selenomonas</i>	<i>S. sputigena</i>
	<i>Campylobacter</i>	<i>C. sputorum</i> <i>C. recta</i>
Bastonetes Gram-positivos	<i>Eubacterium</i>	<i>E. alactolyticum</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. acnes</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. cateniforme</i> <i>L. plantarum</i>
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. israeli</i> <i>A. viscosus</i>
Cocos Gram-positivos	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. anaerobius</i> <i>P. micros</i> <i>P. prevotii</i> , <i>P. magnus</i>
Cocos Gram-negativos	<i>Veillonella</i>	<i>V. parvula</i>
Bactérias Anaeróbias Facultativas		
Cocos Gram-positivos	<i>Streptococcus</i>	<i>S. mitis</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. oralis</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
Bastonetes Gram-negativos	<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i>
	<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. gingivalis</i>
Cocos Gram-negativos	<i>Neisseria</i>	<i>N. sicca</i> <i>N. flava</i>
Bastonetes Gram-positivos	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. xerosis</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. naeslundii</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. propionicum</i>

Algumas bactérias que não se consegue identificar também são descritas em vários estudos (**KANTZ & HENRY, 1974; SUNDQVIST, 1976; ZAVISTOSKI et al., 1980; BYSTROM & SUNDQVIST, 1983; SUNDQVIST et al., 1989; HAAPASALO, 1989; SATO et al., 1983**).

Raramente, tem sido relatado a presença de espiroquetas em canais radiculares infectados. Contudo, **THILO et al. (1986)** utilizando a microscopia de campo escuro relataram a presença de 6% de espiroquetas em canais radiculares. **NAIR (1987)**, por meio da microscopia óptica e eletrônica em dentes com tecido pulpar necrótico e periapicalmente afetados, observou a presença de espiroquetas em canais radiculares, relatando que quando os microrganismos atingiam o corpo da lesão, havia reação por polimorfonucleares (PMN) e formação de abscessos. Do mesmo modo **TROPE et al. (1988)** estudando o diagnóstico de diferenciação de exsudato de abscesso endodôntico e periodontal encontraram espiroquetas em canais radiculares.

ABSCESSOS PERIAPICAIS

Definição e diagnóstico clínico

O tratamento endodôntico tem como um dos objetivos principais, remover bactérias, subprodutos bacterianos e substratos orgânicos e inorgânicos, utilizando substâncias químicas e instrumentos adequados que consigam romper e destruir o ecossistema microbiano presentes no sistema de canais radiculares. Quando as bactérias e/ou suas toxinas atingem a região periapical causam uma resposta inflamatória inicial, que quando não tratadas corretamente podem evoluir para a formação dos abscessos periapicais agudos.

De acordo com **CONSOLARO & RIBEIRO (1998)** abscessos periapicais são reações inflamatórias agudas, caracterizadas por coleções purulentas localizadas, estando implícito o caráter agudo de sua ocorrência do ponto de vista microscópico, havendo presença abundante de neutrófilos, amplas áreas de destruição tecidual e fenômenos vasculares exsudativos. Assim, os termos agudo e crônico à frente de abscesso dento-alveolar referem-se as características clínicas. Portanto, microscopicamente, a definição de um quadro agudo está explícito na palavra abscesso.

O diagnóstico clínico de abscesso dento-alveolar agudo caracteriza-se pelo súbito aparecimento de um quadro altamente sintomático, levando a incapacitação do paciente à sua rotina diária. Já, abscesso dento-alveolar crônico

traduz quadros clínicos com baixa sintomatologia, e longa duração, não interferindo no dia a dia do paciente (**CONSOLARO & RIBEIRO, 1998**).

COHEN & BURNS (1998) definem abscesso como um acúmulo localizado de pus, o que microscopicamente é uma composição de células mortas, resíduos, neutrófilos (polimorfonucleares-PMN) e macrófagos. Clinicamente, ocorrem graus variados de tumefação, com ou sem dor, podendo ocorrer elevação da temperatura. O corpo reage a esta agressão tentando estabelecer a drenagem tanto intra-oral quanto extra-oral. Se a drenagem não for eficaz, o abscesso pode se estender para os espaços ou planos faciais da cabeça e do pescoço, formando uma celulite. Ainda segundo estes autores, uma reação periapical radiográfica presente com resposta inflamatória aguda superposta a lesão crônica preexistente, recebe a denominação de abscesso fênix. Este tipo de abscesso é uma exacerbação aguda de uma inflamação crônica já existente. Se o processo agudo não for tratado e não cicatrizar, a reação se torna crônica. Tal transformação envolve tanto a duração quanto a população celular. O processo inflamatório agudo é uma reação exsudativa, enquanto o processo crônico é uma reação proliferativa. Microscopicamente, são características deste último, a proliferação de fibroblastos, elementos vasculares e a infiltração de macrófagos e linfócitos. Além da reação inflamatória crônica, os macrófagos e linfócitos provocam resposta imune. Enquanto que, presença de neutrófilos e macrófagos caracterizam o processo agudo.

DE DEUS (1992) conceitua abscesso periapical como uma coleção purulenta circunscrita envolvendo os tecidos que circundam a porção apical de um dente ou zona periapical.

Fases Evolutivas Patogênicas

Uma das maneiras de se classificar os abscessos periapicais é principalmente quanto a localização clínica em que ele se encontra no paciente, podendo ser dividido em intra-oral e extra-oral. Os abscessos intra-orais podem ser encontrados nas fases intra-óssea, subperiosteal, submucosa (difusa ou localizada) e fistulada e os extra-orais em difuso e localizado.

A fase intra-óssea caracteriza-se por apresentar a coleção purulenta circunscrita à região periapical avançando para os espaços medulares obedecendo ao princípio da menor resistência. Na fase subperiosteal a cortical óssea apresenta-se reabsorvida, perfurada localmente e o exsudato purulento infiltra-se na interface periosteal/cortical. Mesmo sem o rompimento do periosteal, subprodutos bacterianos podem permear e agredir os tecidos moles adjacente, provocando edema, mas sem pus. Já na fase submucosa, o pus se difunde pelos tecidos moles. Finalmente, na fistulização ocorre a proximidade do pus ao epitélio, provocando sua necrose e havendo drenagem espontânea para superfície perfurada. A fistulização do abscesso caracteriza a última fase patogênica que se estabelece no quadro clínico (**CONSOLARO & RIBEIRO, 1998**).

Contudo, **DE DEUS (1992)** divide as fases dos abscessos periapicais em aguda e crônica. No abscesso agudo, considera o pus confinado à região periapical como a fase intra-óssea. O pus procura caminho de menor resistência para sair e enquanto isto ocorre, produz um aumento de pressão sobre o pericementito causando, em pouco tempo, dor severa. Na continuidade do processo, o pus tenta perfurar o osso cortical e se acumula sob o periosteio, caracterizando a fase subperiosteal. Passa rapidamente pela fase submucosa e quando consegue exteriorizar-se o faz por meio da formação de uma fístula, havendo diminuição ou desaparecimento da dor. A permanência deste quadro clínico por um tempo, passa a caracterizar um abscesso crônico, que é um processo supurativo crônico instalado na região do periápice, geralmente assintomático, podendo eventualmente evoluir para uma exacerbação aguda.

Aspectos Clínicos

Todos os abscessos periapicais evoluem a partir de uma pericementite apical, visto que estas duas entidades clínicas são estágios do mesmo processo patológico; logo suas causas são comuns (**CONSOLARO & RIBEIRO, 1998**).

A necrose pulpar faz parte do quadro clínico característico do abscesso periapical, mesmos nos casos cuja evolução se dá a partir de pericementites apicais por traumatismos acidentais e operatórios, movimentação dentária induzida ou oclusão traumática. No entanto, a quase totalidade dos abscessos periapicais é resultante da evolução da cárie dentária para necrose pulpar, com

posterior envolvimento periapical pelas bactérias e seus produtos. É com o estabelecimento de microabscessos, observadas na microscopia óptica, que diferencia-se a pericementite apical aguda do abscesso periapical agudo. Do ponto de vista clínico, distinguir precisamente este momento é impossível **(CONSOLARO & RIBEIRO, 1998)**.

Os principais aspectos clínicos da fase aguda são: rubor (dilatação dos vasos), tumor (evasão de fluido vascular para os tecidos causando edema), dor (liberação de mediadores da dor como a bradicinina e pressão do tecido devido à hiperemia e ao edema), calor (aumento do suprimento sangüíneo para os tecidos lesionados) e perda da função (devido à dor e ao edema). Observa-se presença de sensibilidade ao teste de percussão e mobilidade dental. A cronificação do abscesso periapical ocorre com a instalação da fístula. A sintomatologia diminui ou desaparece. A sensibilidade à percussão vertical, encontra-se ausente ou reduzida **(COHEN & BURNS, 1998)**.

Aspectos Radiográficos

Quanto aos aspectos radiográficos do abscesso periapical em geral, na fase aguda não apresenta sinais radiográficos significantes. Em alguns casos pode se observar espessamento apical do espaço periodontal. Já na fase crônica, o abscesso periapical revela uma área de reabsorção óssea difusa, muitas vezes de difícil delimitação, podendo se observar perda da continuidade da cortical óssea alveolar **(CONSOLARO & RIBEIRO, 1998)**.

Em algumas situações, o abscesso periapical agudo é secundário a um granuloma ou a um abscesso crônico preexistentes. Nestes casos a imagem radiográfica quase sempre corresponde à lesão primária (**CONSOLARO & RIBEIRO, 1998**).

O diagnóstico definitivo de abscesso periapical agudo e crônico deve ser realizado a partir da associação do exame clínico com a análise radiográfica e nunca isoladamente (**CONSOLARO & RIBEIRO, 1998**).

DE DEUS (1992) afirma que no caso do abscesso agudo a radiografia pode ser negativa ou mostrar espessamento do pericemento apical ou ao longo deste e, ainda, áreas radiolúcidas maiores, representadas pelas lesões periapicais crônicas que se tornaram agudas. No abscesso crônico pode ser observado espessamento do pericemento apical ou mesmo uma área radiolúcida de rarefação difusa do osso, podendo variar desde uma pequena lesão até uma perda óssea maior. A reabsorção externa da parte apical da raiz pode também ser eventualmente observada.

Tratamento

O tratamento dos abscessos periapicais resume-se na eliminação de microrganismos do interior do canal, através de adequado tratamento endodôntico, sendo que, em alguns casos, existe a necessidade de drenagem

através do dente ou dos tecidos moles e antibioticoterapia.

Em resumo, a doença periapical é causada pela combinação de bactérias geralmente anaeróbias, produtos bacterianos, e a resposta do hospedeiro a eles. Os diagnósticos periapicais diferentes apenas refletem os diferentes estágios na resposta inflamatória. Estas lesões não são estáticas, podendo sofrer alterações constantes. São estáticas somente quando vistas ao microscópio **(COHEN & BURNS, 1998)**.

Complicações e conseqüências clínicas

Não instituída a terapia adequada para o tratamento dos abscessos periapicais, estes podem evoluir para complicações e conseqüências clínicas indesejáveis, como por exemplo, osteomielite aguda e crônica purulenta, sinusite maxilar aguda e crônica, angina de Ludwig, periostite ossificante **(CONSOLARO & RIBEIRO, 1998)**. **DE DEUS (1992)** afirma que a difusão da infecção do abscesso periapical agudo, durante a sua fase evolutiva, depende de fatores como: a época em que se inicia o tratamento ou a drenagem, tipos de microrganismos envolvidos, estado geral do paciente, comprimento e situação anatômica do dente afetado no arco, espessura da lâmina cortical e inserções musculares (que podem determinar a rota tomada pela infecção em certos espaços dos tecidos).

ABSCESSOS PERIAPICAIS E AS BACTÉRIAS

O conhecimento das bactérias associadas aos abscessos periapicais é importante no desenvolvimento e entendimento deste processo patológico, bem como, o antimicrobiano eficaz contra tais bactérias (**GOMES, 1995**).

A microbiota dos canais radiculares tornou-se novamente tema de pesquisas após bactérias anaeróbias de pigmento preto serem isoladas de polpas dentais infectadas (incluindo as espécies de *Prevotella* e *Porphyromonas*), e da correlação destas bactérias com os aspectos clínicos tais como dor, mal odor, exsudato, formação de abscessos, presença de fístula, entre outros (**SUNDQVIST, 1976; GOMES et al. 1994a**).

Estudos têm confirmado a associação de uma ou mais espécies de bactérias de pigmento preto com abscessos de origem endodôntica, e que a microbiota presente em dentes com fístula é predominantemente mista e anaeróbia (**VAN WINKENLHOFF et al., 1985; HAAPASALO et al., 1987**).

VAN STEENBERGEN et al. (1982), estudando a virulência das bactérias em monoculturas, relataram que *P. intermedia* causou abscessos localizados enquanto que *P. endodontalis* e *P. gingivalis* causaram apenas processos inflamatórios mais discretos. **SUNDQVIST et al. (1989)** afirmam que *P. gingivalis* está relacionada à produção e rápida disseminação de abscesso, enquanto *P. intermedia* e *P. endodontalis* causam abscessos localizados, sugerindo que a

infecção mista do canal radicular com *P. intermedia*, *P. endodontalis* ou *P. gingivalis* aumenta o risco de se desenvolver uma inflamação purulenta apical. **SIQUEIRA et al. (1998)** observaram que nenhuma das bactérias testadas (*P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum*, *F. necrophorum*) foram patogênicas isoladamente, com exceção da *P. gingivalis* que causou abscesso ulcerativo no subcutâneo do dorso dos ratos inoculados.

YOSHIDA et al. (1987) encontraram correlação entre *Peptostreptococcus magnus* e a presença de exsudato mucoso e, entre *Bacteroides* spp., *Eubacterium* spp. e *Veillonella* spp. com exsudato seroso. **GOMES et al. (1994 a)** encontraram significativa correlação entre o exsudato purulento com a presença de *Prevotella buccae*, *Prevotella loescheii* e *Fusobacterium* spp., especialmente *F. necrophorum*, achados similares àqueles relatados por **BROOK et al. (1981)**.

LEWIS et al. (1990), em uma revisão de literatura, afirma que a microbiota dos abscessos periapicais agudo é freqüentemente polimicrobiana, envolvendo predominantemente *Streptococcus* dependentes de CO₂, cocos Gram-positivos estritamente anaeróbios e bastonetes Gram-negativos estritamente anaeróbios.

ADERHOLD et al. (1981) sugeriram que os *Streptococcus* spp. podem ser importantes nas fases iniciais da formação do abscesso, preparando o ambiente para subsequente invasão anaeróbia. **LEWIS et al. (1986)** isolaram predominantemente *Streptococcus* do grupo “*milleri*” em amostras obtidas no primeiro e segundo dia de sintomas clínicos de abscessos periapicais. Há

também evidências que as bactérias *Streptococcus* do grupo “*miller*” podem agir sinergicamente com as bactérias anaeróbias no desenvolvimento de abscessos (LEWIS et al. 1988).

Na microbiota de canais radiculares associados com abscessos periapicais (TABELA 2), as espécies mais comumente isoladas são os *Streptococcus* e as espécies relacionadas *Enterococcus* e *Gemella*, e os anaeróbios estritos como *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Eubacterium*. As espécies de *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Veillonella* também têm sido encontradas freqüentemente. Outras espécies como *Propionibacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, *Tissierella*, *Campylobacter*, *Actinobacillus* e *Staphylococcus* são também isoladas (SABISTON et al., 1976; ADERHOLD et al., 1981; OGUNTEBI et al., 1982; WILLIAMS et al., 1983; LABRIOLA et al., 1983; WASFY et al., 1992; KULEKÇI et al., 1996).

TABELA 2 - Bactérias comumente isoladas de abscessos periapicais. (SABISTON et al., 1976; ADERHOLD et al., 1981; OGUNTEBI et al., 1982; WILLIANS et al., 1983; LABRIOLA et al., 1983; WASFY et al., 1992; KULEKÇI et al., 1996).

	GÊNERO	Espécies/Grupos comuns
Bactérias Anaeróbias Estritas		
Bastonetes Gram-negativos	<i>Porphyromonas</i>	<i>P. gingivalis</i> <i>P. endodontalis</i>
	<i>Prevotella</i>	<i>P. intermedia</i> <i>P. melaninogenica</i> <i>P. oralis</i> <i>P. oris</i> <i>P. buccae</i> <i>P. corporis</i>
	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i> <i>F. necrophorum</i>
	<i>Campylobacter</i>	<i>C. sputorum</i> <i>C. recta</i>
Bastonetes Gram-positivos	<i>Eubacterium</i>	<i>E. alactolyticum</i> <i>E. limosum</i> <i>E. lentum</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. fermentum</i> <i>L. plantarum</i>
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. israeli</i> <i>A. viscosus</i>
Cocos Gram-positivos	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>P. anaerobius</i> <i>P. micros</i> <i>P. prevotii</i> <i>P. magnus</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>S. constellatus</i>
Cocos Gram-negativos	<i>Veillonella</i>	<i>V. parvula</i>
Bactérias Anaeróbias Facultativas		
Cocos Gram-positivos	<i>Streptococcus</i>	<i>S. mitis</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. oralis</i>
	<i>Gemella</i>	<i>G. morbillorum</i> <i>G. haemolysans</i>
	<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
Bastonetes Gram-negativos	<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. gingivalis</i>
Cocos Gram-negativos	<i>Neisseria</i>	<i>N. sicca</i> <i>N. flava</i>
Bastonetes Gram-positivos	<i>Corynebacterium</i>	<i>C. xerosis</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>Actinomyces</i>	<i>A. naeslundii</i>

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Sabe-se que os antibióticos não promovem o reparo do processo infeccioso, mas permitem controlar a infecção até que os mecanismos de defesa do hospedeiro, inicialmente surpreendidos pelos microrganismos, consigam eventualmente debelar a infecção. Contudo, existem indicações para o uso dos antibióticos, como em casos de abscessos periapicais agudos com envolvimento sistêmico, disseminação do abscesso com ocorrência de tumefação difusa, sintomatologia e/ou exsudação persistente, abscessos periapicais agudos em pacientes de risco e como uso profilático à endocardite bacteriana (**ABBOTT et al., 1990; GRAD, 1997**). Infecções crônicas geralmente não requerem antibioticoterapia, exceto durante uma exarcebação aguda bacteriana (**ABBOTT et al., 1990**). Segundo os mesmos autores lesões periapicais crônicas estão associadas a dentes com polpas necróticas ou a dentes despolpados, ou seja, não possuem suprimento sanguíneo. Afirmam que a concentração de antibiótico que alcança o local de infecção, o canal radicular, é insuficiente para inibir o crescimento bacteriano, quando é administrado antibiótico por via sistêmica. Contudo, em pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana, os antibióticos se tornam um importante profilático para a realização do tratamento endodôntico (**ABBOTT et al., 1990; GRAD, 1997**).

A *American Heart Association* classifica as condições cardíacas mais associadas à endocardite bacteriana em alto risco e risco moderado. 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 são classificadas como de alto risco, e a maioria das malformações cardíacas congênitas, disfunção valvular adquirida, cardiomiopatia hipertrófica, prolapso da válvula mitral com regurgitação valvular e/ou espessamento dos folhetos valvulares como de risco moderado. Recomenda-se em ambas condições, a terapia profilática antimicrobiana para prevenção da endocardite bacteriana (DAJANI et al., 1997; ANDRADE et al., 1998).

Quanto aos procedimentos endodônticos como instrumentação além ápice, cirurgia parendodôntica e reimplante de dentes avulsionados, a *American Heart Association* recomenda profilaxia antibiótica para os pacientes que apresentarem condições de risco (DAJANI et al., 1997; ANDRADE et al., 1998).

Devido à alta concentração e aos níveis prolongados da droga no sangue, a amoxicilina é o antibiótico de escolha para a terapia profilática em pacientes que apresentam condições de risco para o desenvolvimento da endocardite bacteriana (DAJANI et al., 1997).

DEBELIAN et al. (1995) compararam os resultados de coletas microbiológica de 26 canais radiculares, associados a periodontites apicais crônicas, antes da instrumentação, com coletas sangüíneas realizadas, durante e 10 minutos após a instrumentação endodôntica. Todos os canais radiculares e 11 coletas sangüíneas apresentaram microrganismos anaeróbios. As espécies

microbianas isoladas da corrente sangüínea foram: *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Actinomyces israelii*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus sanguis*. Os isolados dos canais radiculares e do sangue apresentaram o mesmo padrão, verificado através de testes bioquímicos e antibiogramas. Concluíram que o canal radicular era o local de origem dos microrganismos encontrados na corrente sangüínea.

Com o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos, o interesse em testes de suscetibilidade antimicrobiana aumentou. Segundo **TOMASZ (1994)** a medicação antibiótica empírica é a grande causa da resistência bacteriana. Portanto, o uso indiscriminado da antibioticoterapia pelos cirurgiões-dentistas, deve ser desencorajado. **HARRISON (1999)** alerta para o problema do surgimento de infecções resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis.

Streptococcus spp. resistentes às penicilinas, podem estar presentes na cavidade oral de pacientes que fazem uso dessa droga constantemente, como nos casos de prevenção de febre reumática aguda. De acordo com as recomendações da *American Heart Association*, nessas condições, pode-se utilizar os antibióticos: clindamicina, azitromicina ou a claritromicina para a terapia profilática contra a endocardite bacteriana (**DAJANI et al., 1997; ANDRADE et al., 1998**).

TESTES DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Concentração inibitória mínima (CIM) de um medicamento, consiste na menor concentração da droga capaz de inibir um microrganismo (**WALKER, 1992**).

De acordo com os critérios estabelecidos pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS*, a CIM é determinada especificamente para um microrganismo. Esta pode ser considerada como suscetível, quando certo microrganismo é inibido pela concentração atingida, de um agente antimicrobiano, no sangue ou tecidos do paciente medicado; suscetibilidade intermediária, quando a concentração inibitória, é similar ou ligeiramente maior, do que aquela normalmente obtida; resistente, quando a concentração do agente antimicrobiano necessária para inibição de um microrganismo, é maior que a alcançada no sangue e tecidos. Esses critérios de interpretação são resultados de estudos que, relacionam a CIM com o nível sérico atingido para cada agente antimicrobiano (**FORBES et al., 1998**).

Assim muitas bactérias, clinicamente importantes, são capazes de mostrar-se resistentes a certos agentes antimicrobianos freqüentemente utilizados na presença de infecções. Portanto, torna-se necessário, em determinadas situações, a realização de testes laboratoriais para detectar a suscetibilidade antimicrobiana ou resistência desses microrganismos (**FINEGOLD et al., 1988**;

CULLMAN et al., 1993; VAN STEENBERG et al., 1993; ROSEMBLATT & BROOK, 1993).

A concentração de um antibiótico necessária para inibir o crescimento de microrganismo *in vitro*, é avaliada através de testes de suscetibilidade antimicrobiana. Os microrganismos são colocados em um mesmo meio *in vitro*, para verificar a viabilidade da bactéria, na presença de um medicamento específico em uma determinada concentração (**FORBES et al., 1998**). Os métodos utilizados são: testes de suscetibilidade convencionais como diluição em caldo (**BARNARD et al., 1996**), diluição em ágar (**BAKER et al., 1985; YAMAMOTO et al., 1989; ABU-FANAS et al., 1991**), método de difusão com discos em ágar (**ZELDOW et al., 1962**), 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**).

A **NCCLS** indica a utilização dos testes de suscetibilidade antimicrobiana 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

terapêutica comprovada para uma infecção específica e da severidade da infecção **FINEGOLD et al., 1988**).

Contudo, os testes de suscetibilidade antimicrobiana apresentam limitações, pois a CIM no plasma, não reflete a concentração do antibiótico no sítio de infecção (**CHAMBERS & SANDE, 1995**).

***Epsilometer test (E-test)* (AB BIODISK, Solna-Suécia)**

O *E-test* consiste em um método simples de realizar e fácil de interpretar, utilizado para testes de suscetibilidade antimicrobiana (CITRON et al., 1991; NGUI-YEN et al., 1992; OLSSON-LIJEQUEST, 1992; BROWN, 1992; BOLMSTRÖM, 1993; VIGIL et al., 1997).

É um teste de suscetibilidade comercial e representa uma variação do método de difusão em ágar. Foi desenvolvido combinando, a conveniência e praticidade do método com disco, com a capacidade de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) (BOLMSTRÖM, 1993).

Constitui-se de uma fita plástica de 50 mm de comprimento e 5 mm de largura, contendo em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento, propiciando a difusão de um gradiente de antibiótico. É interpretado através da formação de uma zona elíptica de inibição, sendo que o ponto de intersecção da borda da zona de inibição com a escala numérica na fita, referente à concentração da droga, representa a concentração inibitória mínima. A fita de *E-test* detecta uma CIM que pode variar de 0,016 a 256 µg/mL, somando o total de 29 diferentes CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (BOLMSTRÖM, 1993).

Em 1992, **BROWN** comparou os resultados das CIMs obtidas através do método do *E-test* e da diluição em ágar, utilizando várias espécies bacterianas isoladas clinicamente, em sua maioria anaeróbias facultativas. Apresentou uma concordância de 87,9% (± 1 grau de diluição). Concluiu que o método do *E-test* apresentou boa correlação com o método de diluição em ágar para a determinação das CIMs. Relatou que o método do *E-test* apresenta versatilidade e facilidade de uso, características desejáveis para a rotina de um laboratório de microbiologia clínica.

OLSSON-LILJEQUIST (1992) utilizando as espécies *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Haemophilus influenzae*, comparou CIMs obtidas através do *E-test* com o método de diluição em ágar de diversos antibióticos em grupos controles recomendados (*American Type Culture Collection – ATCC*) e em grupos com CIMs já estabelecidas. Os resultados demonstraram excelente concordância entre as CIMs obtidas pelos dois métodos, com diferença não superior a ± 1 grau de diluição. Afirmou, que o *E-test* oferece um simples e rápido instrumento para este tipo de avaliação.

NGUI-YEN et al. (1992) avaliaram a exatidão e a reprodutibilidade do *E-test*, comparando-o ao método da microdiluição. Utilizaram 208 espécies bacterianas, incluindo os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, obtiveram resultados semelhantes para os dois métodos comparados. Relatou que o *E-test* mostrou ser 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 ± 1 diluição. Concluíram que o *E-test* consiste em um método simples, seguro e capaz de ser reproduzido para a determinação da CIM de organismos Gram-positivos.

O método do *E-test* também tem indicações para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas (CITRON et al., 1991; NACHNANI et al., 1992; BOLMSTRÖM, 1993; CONTI, 1997). Devido ao crescimento lento de algumas bactérias anaeróbias estritas, os testes de suscetibilidade passam a ser mais desafiantes, quando comparados com bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (FINEGOLD et al., 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993; AB BIODISK, 2000).

A resistência de bactérias anaeróbias estritas à agentes antimicrobianos tem aumentado, sendo necessário, mais informações sobre o antibiótico adequado contra determinados microrganismos (WEXLER, 1993). Conseqüentemente, testes de suscetibilidade antimicrobiana têm sido realizados com maior freqüência, contudo, não há um método que possa ser utilizado com segurança dos resultados, devido as dificuldades de reprodutibilidade do teste e/ou à incapacidade de crescimento de certas bactérias anaeróbias estritas em determinados meios de cultura (FINEGOLD et al., 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993).

FINEGOLD et al. (1988) em um trabalho de revisão de literatura recomenda que microrganismos que são reconhecidos como potenciais patógenos e/ou frequentemente resistentes, como *Bacteroides fragilis*, "*Bacteroides produtores de pigmento preto*", *Bacteroides gracilis*, determinados *Fusobacterium* spp., e *Clostridium* spp., deveriam ser considerados indicados para testes de suscetibilidade antimicrobiana.

Para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas, a *NCCLS* preconiza os seguintes métodos padronizados: diluição em ágar e microdiluição em caldo (**FINEGOLD et al., 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993**). Entretanto, o método do *E-test* tem sido avaliado e tem apresentado resultados positivos, quando comparados com métodos padronizados da diluição em ágar (**CITRON et al., 1991; NACHANI et al., 1992; BOLMSTRÖM, 1993; CONTI, 1997**). Contudo, **LE GOFF et al. (1997)** com objetivo de verificar a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de polpas necróticas, utilizaram o *E-test* e observaram que, no total de 66 bactérias anaeróbias estritas testadas, apenas 38 apresentaram resultados confiáveis após a leitura no tempo máximo citado pelos fabricantes (AB BIODISK, 2000) de 48 horas. Realizaram a leitura dos testes após 24 e 48 horas de incubação, sendo a segunda leitura idêntica à diluição mais próxima. Os autores afirmam que, embora os resultados encontrados fossem satisfatórios, a razão entre o número de espécies testadas e de resultados obtidos era insuficiente, confirmando que nenhum método é universalmente aplicável para as bactérias anaeróbias estritas. Explicaram ainda, que algumas bactérias necessitam de um período de incubação superior a 48

horas, tempo durante o qual as moléculas de antibióticos poderiam sofrer degradação, levando a mensuração incorreta do gradiente de concentração.

BOLMSTRÖM, 1993 relata que testes baseados em gradiente de concentração de antibiótico, somente é confiável, se este se manter estável por um período superior ao tempo crítico para o crescimento dos microrganismos testados, sendo de 5-12 horas. Afirma que o *E-test*, quando colocado sobre o ágar, seu gradiente de concentração de antibiótico se mantém estável por no mínimo 12 horas, cobrindo o tempo crítico de iniciação do crescimento da maioria das bactérias anaeróbias estritas.

CITRON et al. (1991) compararam as concentrações inibitórias mínimas determinadas pelos métodos do *E-test* e diluição em ágar, utilizaram 105 espécies de bactérias anaeróbias dentre elas, *Peptostreptococcus* spp. e *Fusobacterium* spp., isoladas clinicamente. Observaram que na maioria das combinações antibiótico-microrganismo, a zona elíptica de leitura foi clara e o ponto de intersecção bem definido. As CIMs foram interpretadas após *overnight* e 48 horas de incubação de 58 espécies. Os dois métodos apresentaram correlação positiva em 87% (± 1 diluição) e em 98% (± 2 diluições) após *overnight* e, 86% e 97% em 48 horas de incubação, respectivamente, para o *E-test* e diluição em ágar. Os autores afirmaram que, o *E-test* constitui-se de um método confiável para teste de suscetibilidade, tanto de bactérias anaeróbias de crescimento rápido, cujos resultados foram obtidos *overnight*, quanto àquelas de crescimento mais lento.

CONTI (1997) testou a suscetibilidade antimicrobiana de 20 espécies de *Prevotella intermedia/nigrescens* e 19 de *Porphyromonas gingivalis* isoladas da bolsa periodontal. As CIMs foram obtidas, após 48 horas, e estabelecidas para todas as espécies testadas e o padrão de suscetibilidade determinado. Concluiu que o método é reproduzível, prático e sensível para determinar o padrão de suscetibilidade das espécies bacterianas anaeróbias estritas testadas.

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE ABSCESSOS PERIAPICAIS AGUDOS

O conceito de infecções mistas para abscessos periapicais agudos, tornou
significante as considerações sobre a terapia antibiótica (**MATUSOW, 1981**).

Segundo **FINEGOLD (1977)** a importância da terapia antimicrobiana é
inquestionável no tratamento de algumas infecções agudas. Todavia, este é mais
um instrumento para o sucesso do tratamento das infecções odontogênicas
agudas. Ambos, endodontistas e cirurgiões, devem observar conceitos
fundamentais, incluindo adequada drenagem, debridamento de tecido infectado e
necrótico, descompressão de edema e adequado tratamento sintomático. O
resultado é então, direcionado em favor da resistência do hospedeiro.

HUNT et al., 1978 avaliaram a suscetibilidade de bactérias isoladas de
exsudatos de infecções odontogênicas agudas. De 74 espécies testadas, 68 foram
cultiváveis em ágar-sangue. Utilizaram método com disco e os antibióticos
ampicilina, cefalotina, eritromicina e penicilina. Todas as espécies de
Streptococcus isoladas, foram consideradas suscetíveis ou moderadamente
suscetíveis à ampicilina, cefalotina e penicilina, sendo que os *Peptostreptococcus*
spp. apresentaram-se resistentes a eritromicina e suscetíveis a ampicilina e
penicilina.

Com o propósito de avaliar a evolução da microbiologia das infecções orais e a suscetibilidade antimicrobiana, **HUNT & MEYER (1983)** analisaram 235 pacientes com infecções odontogênicas agudas, entre 1978 e 1981. Em discordância com o trabalho de 1978 dos mesmos autores, observaram que em aproximadamente 15% das espécies de *Streptococcus viridans* isoladas, tornaram-se resistentes à penicilina. Os autores sugerem que talvez, o fato de maior importância, tenha sido o aparecimento de espécies de *Peptostreptococcus* (cerca de 15%) resistentes à ampicilina e penicilina.

MATUSOW (1981) testou a efetividade de 10 antibióticos contra 105 microrganismos especificamente isolados de 78 canais radiculares de dentes envolvidos com abscessos periapicais agudos. Utilizou o método com disco para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana de espécies aeróbias e anaeróbias facultativas, e o mesmo método, modificado para anaeróbias estritas. Analisando a efetividade, a eritromicina foi considerada como a droga de escolha para terapia inicial. O gênero *Streptococcus* foi o isolado predominante, sendo os *Enterococcus* spp. os mais resistentes. Os *Peptostreptococcus* spp. apresentaram sensibilidade aos seguintes antibióticos: tetraciclina, eritromicina, penicilina, clindamicina e ampicilina. As espécies *Fusobacterium* mostraram-se sensíveis para tetraciclina, penicilina, clindamicina e ampicilina, sendo que para a eritromicina de 4 espécies testadas, 2 apresentaram-se sensíveis e 2 resistentes.

FOUAD et al. (1996) questionam que se admitirmos que nos abscessos periapicais agudos existem bactérias, por que o antibiótico pode não ter

efetividade para reduzir ou controlar determinadas bactérias? O autor afirma, que para um antibiótico ser efetivo, este tem que alcançar o tecido infectado envolvendo uma suficiente concentração, e também agir na suscetibilidade bacteriana. Ainda afirma, que uma simples administração de antibiótico via oral, alcança áreas de granulomas e cistos em concentrações terapêuticas. Contudo, esses pareceres podem não aplicar em abscessos periapicais que tem áreas de necrose e falta de suprimento vascular.

Antibióticos não devem ser administrados sem justificativa na terapia. O uso indiscriminado de antibióticos como suplemento do tratamento em todas as infecções dentais, pode levar a sérias consequências incluindo reações alérgicas, desenvolvimento de superinfecções com espécies bacterianas resistentes e desnecessária exposição do paciente a certas toxicidades e efeitos colaterais dos medicamentos (**FOUAD et al., 1996**).

A fim de se evitar seleção e predomínio de microrganismos resistentes, o antibiótico de escolha deve ser reconhecidamente eficaz contra as espécies isoladas do processo infeccioso, podendo ser indicado coletas de amostras microbiológicas dos canais radiculares, não somente para se identificar os microrganismos presentes na infecção, mas também, para seleção do agente antimicrobiano a ser utilizado (**MORSE, 1970**).

RASMUNSEN et al. (1993) descreveram os possíveis mecanismos de resistência antimicrobiana dos *Bacteroides*, enfatizando a importância destes

conhecimentos na seleção do agente terapêutico. Entretanto, estes padrões de resistência não são fixos, sendo possível o surgimento de bactérias resistentes, o que torna importante o monitoramento constante destes padrões, através de testes de sensibilidade antimicrobiana (**CITRON et al., 1991; JANSEN & BREMMELGAARD, 1991**).

Portanto, um maior conhecimento das bactérias encontradas em canais radiculares associados aos abscessos periapicais, assim como seu comportamento frente a diversos antimicrobianos, podem colaborar no desenvolvimento da prática endodôntica.

PROPOSIÇÃO

A compreensão e interpretação do papel e dos mecanismos desempenhados pelos microrganismos na etiopatogenia dos processos patológicos pulpare e periapicais é muito importante, podendo, inclusive, interferir no planejamento e conduta do tratamento endodôntico. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi:

1. Investigar a composição da microbiota de canais radiculares infectados, associados a abscessos periapicais;
2. Determinar se há correlação entre espécies bacterianas específicas e a localização clínica dos abscessos periapicais;
3. Determinar a existência de correlação entre os microrganismos encontrados e os diferentes sinais e sintomas;
4. Analisar a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas clinicamente de canais radiculares associados aos abscessos periapicais, à diversos antibióticos, através do teste de sensibilidade antimicrobiana (*E-test*).

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DOS CANAIS RADICULARES

Pacientes

Seleção dos pacientes

Participaram deste estudo 30 pacientes com necessidade de tratamento endodôntico, de dentes associados a abscessos periapicais, sem história de antibioticoterapia prévia. Os pacientes assinaram termo de consentimento elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (ANEXO).

Avaliação dos pacientes

Para cada paciente foram anotados dados pessoais, história médica significativa, história dentária (condição pulpar e periapical, presença ou não da dor, profundidade de bolsas periodontais, mobilidade dental, presença ou não de cáries e restaurações), exames intra e extra-bucais (presença de fístula e sua origem, presença de edema dos tecidos periodontais, simetria facial, aparência geral), história de antibioticoterapia prévia nos 3 meses anteriores ou outras medicações, e os achados radiográficos.

Critérios clínicos para diferenciação da localização dos abscessos periapicais

Os critérios clínicos utilizados para a diferenciação da localização dos abscessos estão descritos resumidamente na **FIGURA 1-** a seguir:

FIGURA 1- Critérios clínicos para diferenciar as fases dos abscessos periapicais.

ABSCESSOS PERIAPICAIS					
SIN/ SINT	Intra-Oral				Extra-Oral
	SP	SM	FZ	IOs	
DOR	+	+	+/-	+	+
DOR PALP	+	+	+/-	-	+
EDEM	-	+	+/-	-	+
T PERC	+	+/-	+/-	+	+
MOB	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
LES PP	-	-	+	+	+
ESPES	+	+	-	-	-
DIFUSO	-	+/-	+/-	-	+/-
LOCALIZ	+	+/-	+	+	+/-

Legenda: SP=subperiósteo; SM=submucoso; FZ=fistulização; los=Intra-ósseo; Sin/ Sint/= Sinais e Sintomas; DOR= sintoma de dor espontânea; DOR PALP=sintoma de dor ao teste de palpação no fundo de sulco; EDEM=sinal de tumefação intra e/ou extra-oral; TPERC= teste à percussão dental; MOB.= teste de mobilidade dental; LES PP= lesão periapical observada na radiografia; ESPES=espessamento do ligamento periodontal observado na radiografia; DIFUSO=abscesso difuso; LOCALIZ= abscesso localizado.

+ = presente - = ausente +/- = pode ou não estar presente

Coleta das amostras

Foram coletadas amostras microbiológicas apenas de canais radiculares de dentes com diagnóstico clínico de abscesso periapical. A assepsia foi mantida durante toda a terapia endodôntica e durante coleta de amostras microbiológicas com a remoção de contaminantes coronários, isolamento absoluto do dente com a utilização do lençol de borracha e descontaminação do campo operatório com a utilização do hipoclorito de sódio 1% e neutralização com tiosulfato de sódio 0,5%, para se evitar a contaminação química do espaço pulpar (**MÖLLER, 1966**). Após abertura coronária, realizou-se coleta das amostras microbiológicas sob fluxo contínuo de nitrogênio (**FIG. 2**), para manter a viabilidade das bactérias anaeróbias (**BERG & NORD, 1973**). Esse procedimento foi realizado com o auxílio de um cilindro de gás nitrogênio, ao qual se encontra acoplado uma válvula de segurança (WHITE MARTINS, mod. R 86-N, São Paulo, Brasil), uma mangueira e uma cânula aspiradora endodôntica, formando um dispositivo que direciona o gás somente para a região do dente no qual foi realizada a coleta (**FIG. 2**).

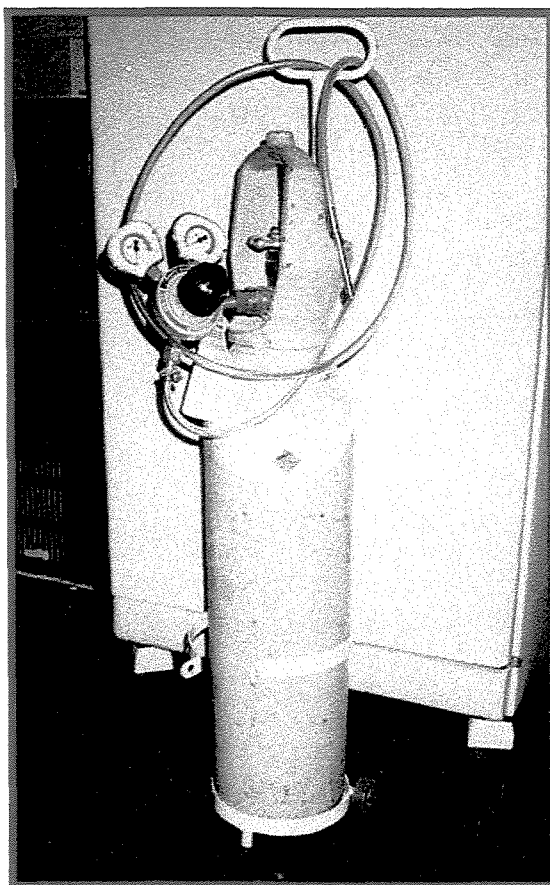


FIGURA 2- Cilindro de gás nitrogênio, ao qual se encontra acoplado uma válvula de segurança (WHITE MARTINS, mod. R 86-N, São Paulo, Brasil), uma mangueira e uma cânula aspiradora endodôntica, formando um dispositivo que direciona o gás somente para a região do dente no qual é realizada a coleta microbiológica.

De cada dente foi coletada amostras microbiológicas de um único canal radicular. Nos dentes multirradiculares foi realizada a coleta no canal mais amplo (molares inferiores no canal distal e molares superiores no canal palatino), de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico.

Nos casos em que os canais radiculares apresentaram-se secos, foi realizado irrigação com solução salina estéril para propiciar um ambiente úmido favorecendo a coleta microbiológica.

Já nos casos de retratamento, foi executada a remoção do material obturador com brocas de Gates-Glidden e limas endodônticas, sem o uso de solventes de guta-percha. Após realizou-se uma tomada radiográfica para verificar a remoção do material obturador. À seguir, com solução salina estéril uma irrigação profusa do canal radicular foi realizada, para remover qualquer resíduo de material e, deixar o canal úmido para a coleta microbiológica.

As amostras foram coletadas no início da primeira intervenção endodôntica com pontas de papel absorvente estéreis introduzidas no comprimento do canal, determinado pela radiografia pré-operatória, permanecendo nesta posição por 60 segundos (**FIG. 3A**).

Inoculação e Incubação

As pontas de papel absorvente com a coleta foram imediatamente colocadas em eppendorf estéril com 1,0 mL de meio de transporte VMGA III - Viability Medium Göteborg Agar- (**MÖLLER, 1966; DAHLÉN et al., 1993**) (**FIG. 3B e ANEXO**), o qual foi transportado para o laboratório de Microbiologia da área de Endodontia e colocado na câmara de anaerobiose. Os eppendorfs foram agitados mecanicamente (Agitador - MA 162-MARCONI, São Paulo, Brasil) por 1 minuto (**FIG.3C**). À seguir, foram realizadas diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 em meio para anaeróbios exigentes - Fastidious Anaerobe Broth (FAB) LAB-M, Bury - Inglaterra) (**FIG. 3D e ANEXO**) e inoculados 50 µL de cada diluição em placas pré-reduzidas de Fastidious Anaerobe Agar (FAA, LAB-M, Bury-Inglaterra) e FAA + suplementos seletivos para anaeróbios (GN-OXOID-Hampshire-Inglaterra) (**FIG.3E e ANEXO**), as quais foram incubadas em cabine de anaerobiose (DON WHITLEY SCIENTIFIC, Bradford-Inglaterra) (**FIG. 3F**), a 37°C na atmosfera de 10% de H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de organismos de crescimento lento.

Os meios de transporte foram preparados de acordo com a fórmula original (**MÖLLER, 1966; DAHLÉN et al., 1993**) e os de cultura foram preparados de acordo com as orientações dos fabricantes.

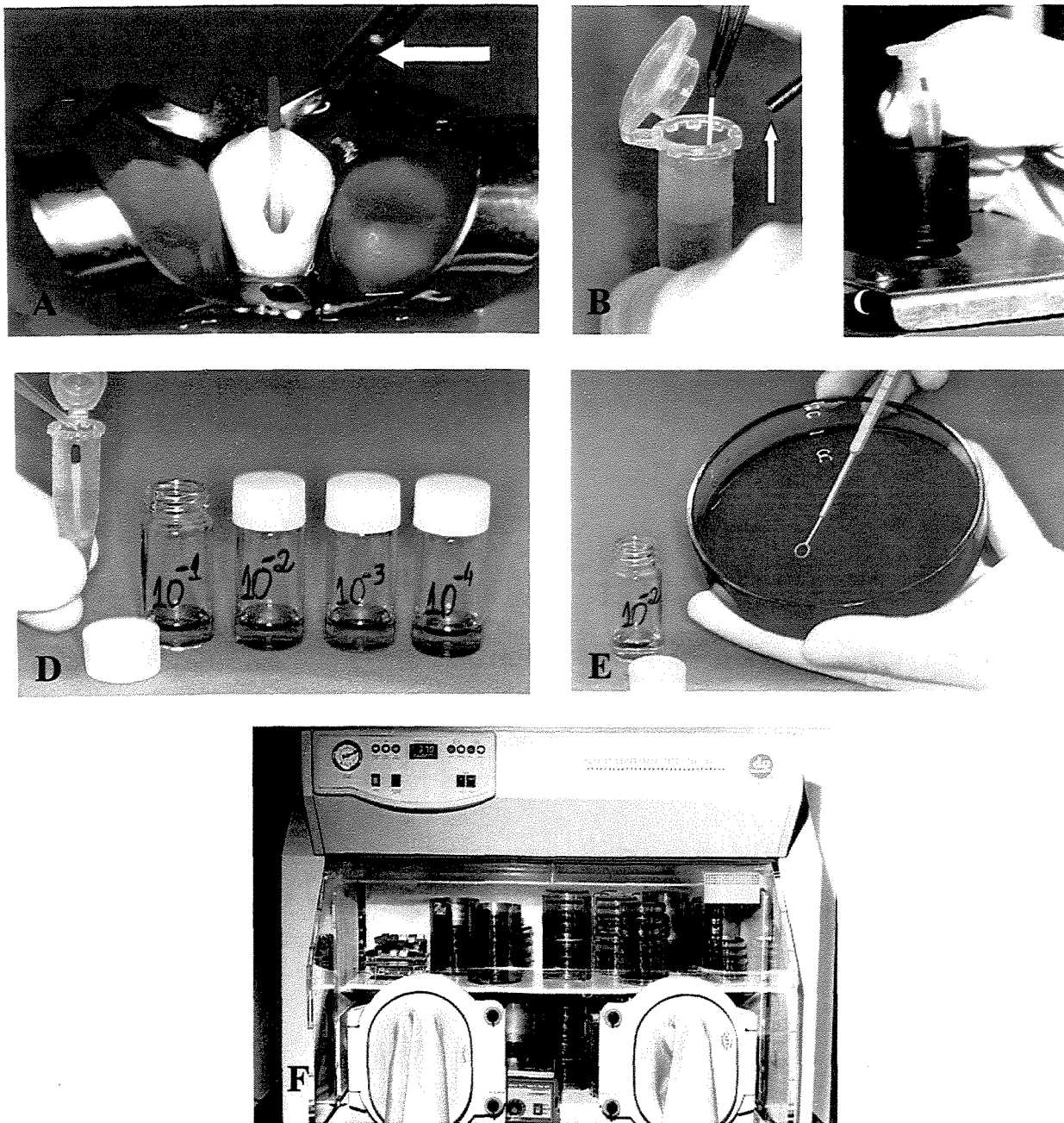


FIGURA 3 A-Coleta do canal radicular com ponta de papel absorvente sob fluxo contínuo de nitrogênio com auxílio da cânula de aspiração endodôntica (ver seta), B- Colocação da coleta microbiológica com ponta de papel absorvente no meio de transporte VMGA III sob fluxo contínuo de nitrogênio com auxílio da cânula de aspiração endodôntica (ver seta), C-Agitador de tubos com eppendorf, D-Diluição, E- Inoculação em placa de ágar-sangue, F- Câmara de anerobiose para incubação bacteriana.

As amostras do canal radicular foram inoculadas e incubadas em placas pré-reduzidas como a seguir:

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA (Fastidious Anaerobe Agar), à 37° C, aerobicamente, por 2 dias para selecionar aeróbios e anaeróbios facultativos.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA, à 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios estritos e facultativos.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL (ácido nalidíxico) + VAN (vancomicina), à 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + KAN (Kanamicina) + VAN (vancomicina), à 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos, particularmente as bactérias pigmentadas em preto.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NEO (neomicina), à 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar clostrídios e outros anaeróbios.

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL (ácido nalidíxico) à 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-positivos e actinomicetos.

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**).

Isolamento e Identificação microbiana

Os métodos para análise morfológica das bactérias foram os seguintes:

As placas com crescimento microbiano foram observadas em Lupa Estereoscópica (LAMBDA LET 2, ATTO INSTRUMENTS CO., Hong Kong) em aumento de 3 vezes. As colônias bacterianas foram diferenciadas de acordo com suas características macroscópicas. O critério usado para selecionar diferentes colônias foi a sua aparência na placa observando-se forma, elevação, cor, textura, opacidade, tamanho e hemólise. À seguir foram isoladas em duas placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro (**FIG.4A**), sendo uma para cada condição gasosa (câmara de anaerobiose e estufa de cultura-O₂) para obter cultura pura (**FIG. 4B**) e observar em qual condição gasosa a bactéria melhor se proliferou (**FIG. 4C-D**). Em seguida, as culturas puras foram inicialmente identificadas de acordo com o Método de Coloração de Gram (Gram-positiva ou Gram-negativa) (**FIG. 4E**). Por fim, realizou-se o teste da Produção da Catalase

(positiva ou negativa) (**FIG. 4F**). Após obtenção dos dados morfológicos, para as bactérias de pigmento preto (*Porphyromonas* e *Prevotella*), além da identificação microbiana com auxílio dos testes bioquímicos comerciais (**FIG. 4G**), foi também realizado testes adicionais como a Fluorescência sob luz UV (**FIG. 4H-I**).

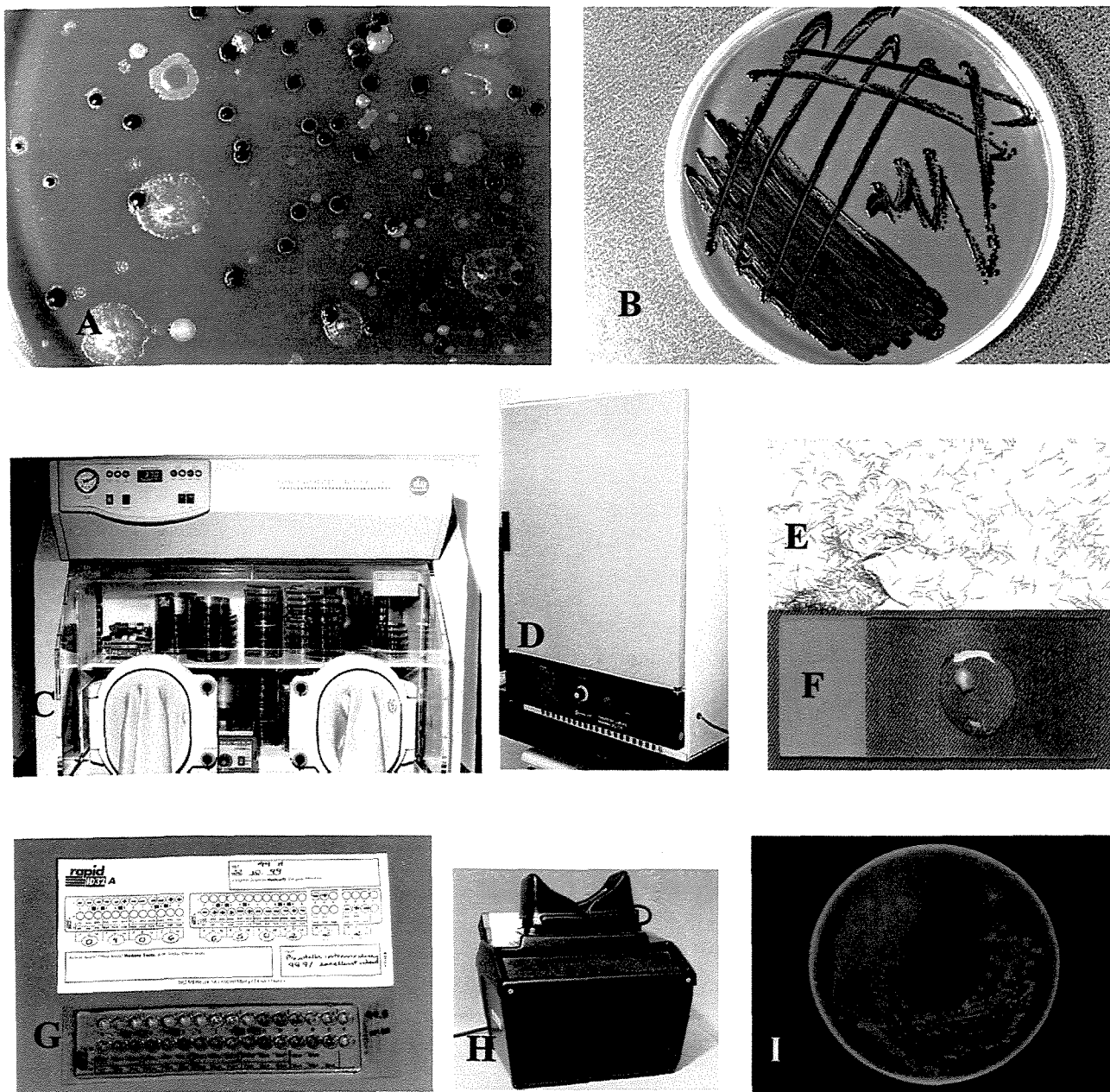


FIGURA 4- A- Primeira cultura, B- Cultura pura, C-D- Requerimento gasoso obtido com a câmara de anaerobiose (C) e estufa de cultura microbiológica (D), E- Morfologia microscópica utilizando-se o método de coloração de Gram, F- Teste de Produção de catalase com H_2O_2 , G- Ficha do "kit" de Identificação utilizada na verificação da especiação bacteriana, H- Aparelho utilizado para observação da fluorescência sob luz UV bacteriana e I-Fluorescência sob luz UV da *Prevotella intermedia*

Especiação microbiana

Os seguintes métodos de identificação padronizados (testes bioquímicos) **(ANEXO)** foram utilizados para a especiação primária dos organismos isolados:

- RapID ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios.
- RapID ANA II System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., EUA) para cocos e bastonetes Gram-positivos e Gram-negativos, anaeróbios obrigatórios.
- API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para estafilococos e micrococos (cocos Gram-positivos, catalase positiva).
- RapID ID 32 Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa).
- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase negativa).
- RapID NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, Ga., EUA) para Eikenella, Haemophilus, Neisseria e Actinobacillus.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

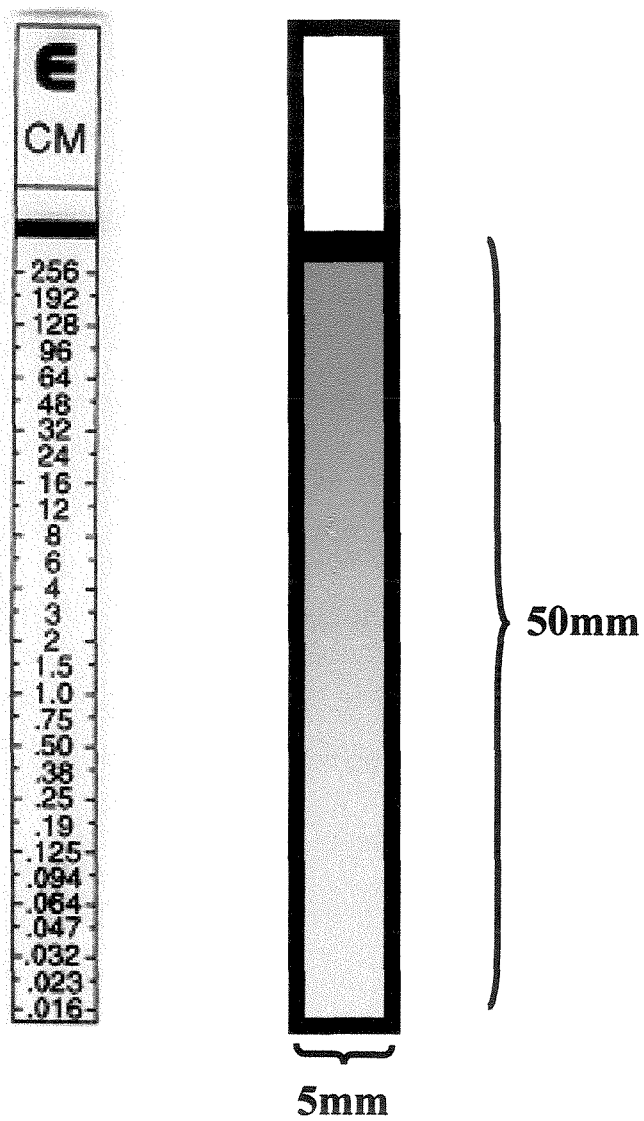
Os dados coletados foram colocados em uma planilha de cálculo (QUATTRO PRO, Bordland International Inc., Scotts Valley, CA, EUA) e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). O teste de "Pearson chi-square", ou o "Fisher's Exact test", quando apropriado, foi escolhido para testar a hipótese nula da relação entre a presença de abscesso periapical e as espécies bacterianas identificadas.

Teste de suscetibilidade antimicrobiana

As bactérias anaeróbias *Peptostreptococcus prevotii* (Cocos Gram-positivos anaeróbios) e *Fusobacterium necrophorum* (Bastonetes Gram-negativos anaeróbios) coletadas de canais radiculares associados com abscessos periapicais, foram submetidas ao teste da suscetibilidade antimicrobiana.

Foi utilizado um teste baseado em técnicas de diluição e de difusão em ágar, o **E-test** (AB BIODISK, Solna-Suécia). Este sistema compreende um gradiente exponencial pré determinado do quimioterápico a ser testado, para definir a concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL de antibióticos individuais contra bactérias (CONTI, 1997; VIGIL, et al. 1997). Esse método consiste em uma fita plástica, fina, inerte e não porosa de 5 mm de largura e 50 mm de comprimento (FIG.5). A fita é marcada com uma escala numérica de leitura e um código de 2 letras na porção superior que designa a identidade do antimicrobiano a ser testado, um gradiente exponencial e pré definido da substância seca e estabilizada é mobilizado no outro lado da fita (CONTI, 1997).

Esta fita pode detectar uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) que varia de 0,016 a 256 µg/mL, com total de 15 níveis de diluição (BOLMSTRÖM, 1993) (FIG. 5).



FRENTE (5A)

VERSO (5B)

FIGURA 5 A-Fita de *E-test* (FRENTE), B- Esquema do gradiente exponencial do antibiótico (VERSO)

As fitas de *E-test* devem ser armazenadas a - 20°C com sílica gel, que deve estar com a coloração azul, sendo colocadas individualmente em tubos.

As bactérias foram testadas quanto suas suscetibilidade/resistência aos seguintes antibióticos: amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, benzilpenicilina, metronidazol e as drogas eritromicina, azitromicina e clindamicina, pois são antibióticos de primeira escolha para pacientes sensíveis à penicilina.

Para a realização do teste foi preparado o inóculo (meio em caldo + bactéria), com a espécie bacteriana previamente incubada em placas contendo FAA (Fastidious Anaerobe Agar) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado (**FIG.6A**) na câmara de anaerobiose. Após 72 horas de incubação, as colônias bacterianas foram transferidas para tubos contendo o meio em caldo FAB (Fastidious Anaerobe broth) (**FIG. 6B**), em seguida agitado por 1 minuto (**FIG. 6C**), para atingir a turbidez equivalente ao padrão 1 de Mc Farland (NEFELOBAC, PROBAC – São Paulo- Brasil), padrão indicado para bactérias anaeróbias estritas (AB BIODISK, 2000). Este procedimento foi realizado utilizando-se o aparelho Espectrofotômetro com comprimento de onda de 800 nm (MARCONI, São Paulo, Brasil) (**FIG.6D**).

A seguir, foi realizado o repique das cepas bacterianas em placas pré-reduzidas, contendo Brucella Ágar (OXOID, Hampshire-Inglatera) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado, adicionando-se 600µL de vitamina K e de

hemina para o adequado crescimento das bactérias anaeróbias estritas (**ANEXO**), com 4mm de espessura de meio. A semeadura foi realizada em toda extensão da placa uniformemente utilizando swab estéril, que foi umedecido na suspensão bacteriana (**FIG.6E**). Finalizada esta etapa, esperou-se de 10 a 15 min. para a secagem das placas. As fitas de *E-test*, previamente removidas do congelador e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos, foram distribuídas nas placas (**FIG.6F**). Para este procedimento foram utilizadas pinças estéreis, 1 para cada fita de antibiótico testado. O experimento foi executado em duplicata e em câmara de fluxo laminar (MARCONI, São Paulo, Brasil).

As placas foram então levadas a câmara de anaerobiose a 37°C em atmosfera de 10% H_2 , 10% CO_2 e 80% N_2 . Após, foi realizada a leitura com 24 e 48 horas de incubação. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do *E-test*, considerando o ponto de intersecção a inibição completa de crescimento bacteriano (**FIG.7A-B**).

A interpretação dos valores das CIMs das fitas de *E-test* em diferentes categorias de sensibilidade, foi realizada de acordo com o guia de interpretação da NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*).

As espécies de *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* foram testadas contra os antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina. A azitromicina e eritromicina não

fornececeram resultados confiáveis com o *E-test*, pois as CIMs desses antibióticos para as bactérias anaeróbias estritas não foram ainda determinadas pela NCCLS (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 3).

TABELA 3 – Valores interpretativos de concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) dos antimicrobianos avaliados nos testes de bactérias anaeróbias estritas pelo NCCLS-M100 S8/M11 A4.

Agentes antimicrobianos	Suscetível	Intermediário	Resistente
Benzilpenicilina	$\leq 0,5$	01,0	$\geq 02,0$
Amoxicilina	$\leq 4,0$	08,0	$\geq 16,0$
Amoxicilina + Ácido Clavulânico	$\leq 2,0$	04,0	$\geq 08,0$
Metronidazol	$\leq 8,0$	16,0	$\geq 32,0$
Clindamicina	$\leq 2,0$	04,0	$\geq 08,0$



FIGURA 6- A- Cultura pura, B- Preparo do inóculo bacteriano, C- Agitação do inóculo, D- verificação da turbidez do meio no espectrofotômetro, E- Inoculação na placa de ágar-sangue, F- Placa com a fita do *E-test*, G- Fita do *E-test*, H- Embalagem da fita do *E-test*

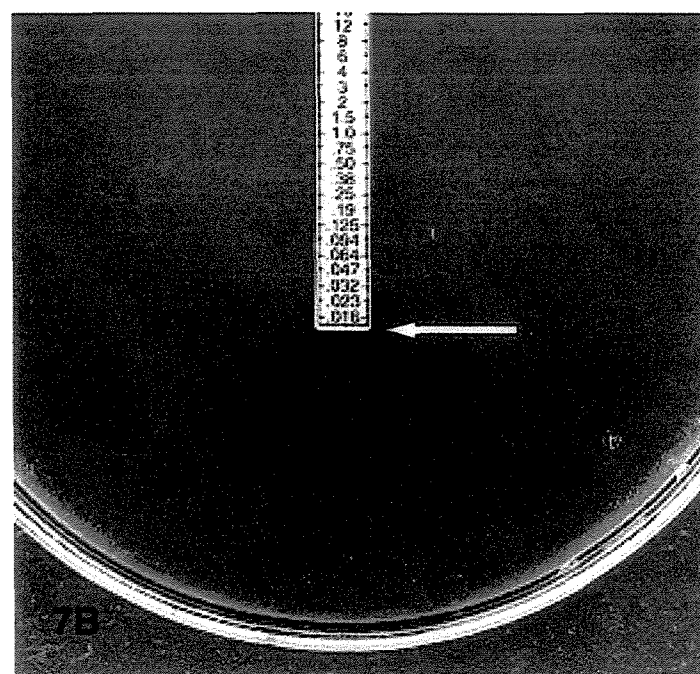
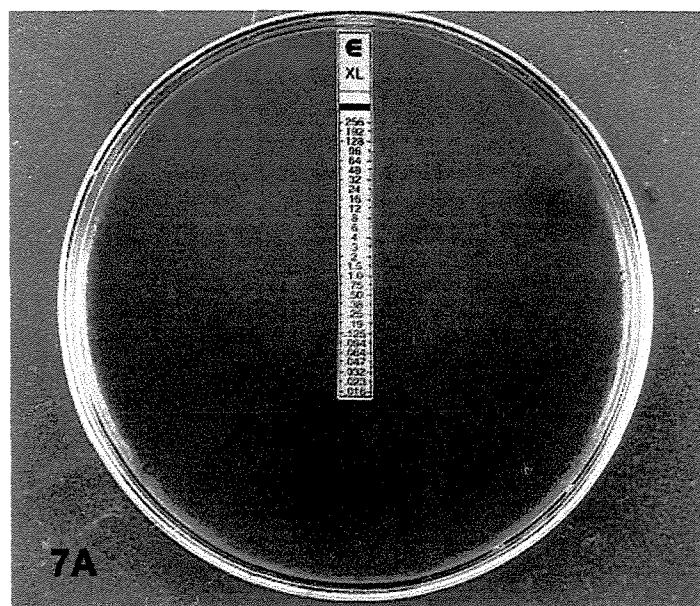


FIGURA 7- A- Placa com crescimento bacteriano e a fita de *E-test*, **B-** Aumento da figura 7A , mostrando com a seta, o ponto de intersecção entre o halo de completa inibição bacteriana e a fita de *E-test*

RESULTADOS

Dos 30 canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais investigados em 1 não ocorreu crescimento bacteriano e dos 29 (96,6%) restantes isolou-se um total de 117 espécies bacterianas (1 ou mais no máximo de 10 espécies foram encontradas nos canais radiculares), mostrando que houve incidência média de 3,9 bactérias por canal radicular. Destes 117 microrganismos, 75 foram identificados como anaeróbios estritos e 42 como anaeróbios facultativos, sendo 29 Gram-negativos e 88 Gram-positivos (TABELA 4, 5 e FIGURA 9).

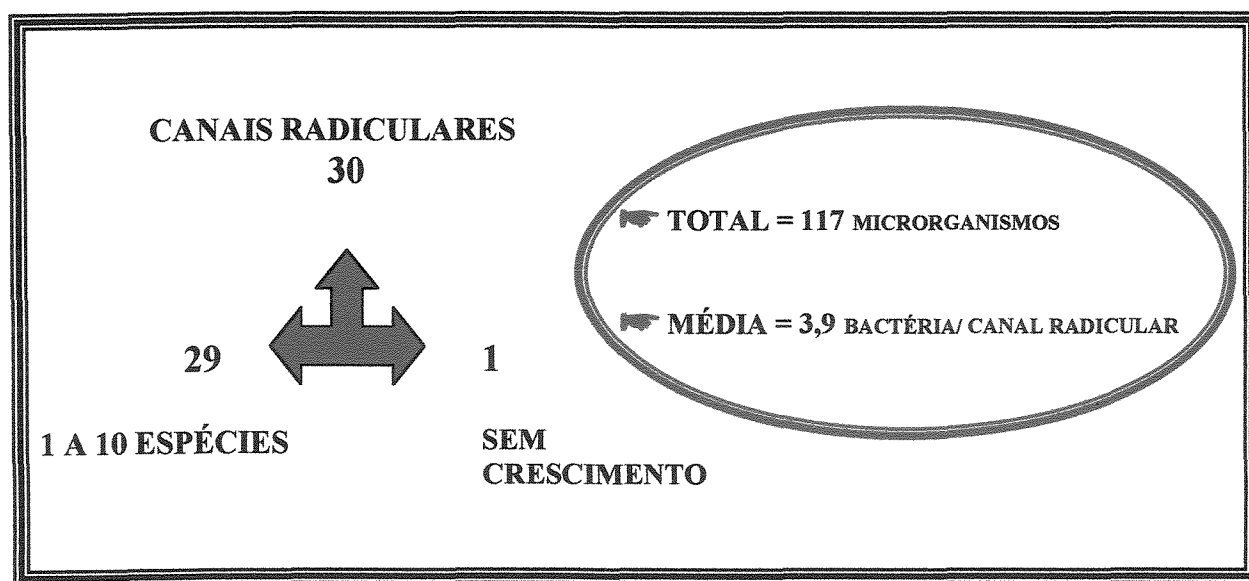


FIGURA 8- Esquema representativo contendo número total de canais radiculares investigados com e sem crescimento bacteriano, número total de microrganismos isolados e média de bactérias por canal radicular.

TABELA 4 - Frequência de microrganismos anaeróbios estritos e facultativos isolados de 30 canais radiculares associados a abscessos periapicais.

Microrganismos	Número		%
Anaeróbios	75		64,1
Facultativos	42		35,9
Total de Microrganismos	117		100

TABELA 5 - Frequência de microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos isolados de 30 canais radiculares associados a abscessos periapicais.

Microrganismos	Número		%
Gram-positivo	88		75,2
Gram-negativo	29		24,8
Total de Microrganismos	117		100

Oitenta por cento (24) dos canais radiculares analisados continham bactérias anaeróbias estritas e 76,6% (23) anaeróbios facultativos. Bactérias Gram-negativas foram encontradas em 56,6% (17) dos canais radiculares e Gram-positivas em 96,6% (29) (**TABELA 6 , 7 e FIGURA 9**).

TABELA 6 - Frequência de canais radiculares investigados apresentando microrganismos anaeróbios ou facultativos (n=30).

Microrganismos	Canais radiculares	
	Número	%
Anaeróbios	24	80,0
Facultativos	23	76,6

TABELA 7 - Frequência de canais radiculares investigados apresentando microrganismos Gram-positivos ou Gram-negativos (n=30).

Microrganismos	Canais radiculares	
	Número	%
Gram-positivo	29	96,6
Gram-negativo	17	56,6

As bactérias anaeróbias mais isoladas foram: *Peptostreptococcus prevotii* (43,3%), *Peptostreptococcus micros* (30,0%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%), *Streptococcus constellatus* (20,0%), *Prevotella intermedia/nigrescens* (10,0%), *Prevotella corporis* (10,0%) e *Veillonella* spp. em (10,0%) (**TABELA 8 e FIGURA 10**).

Embora menos frequentes, bactérias anaeróbias facultativas como *Gemella morbillorum* (30,0%), *Streptococcus mitis* (20,0%) e *Gemella haemolysans* (13,3%) foram também encontradas (**TABELA 8 e FIGURA 10**).

TABELA 8 - Frequência de todos os microrganismos encontrados nos canais radiculares investigados (n=30), exigência gasosa e coloração de Gram.

Espécies	Gram + ou -	Exigência gasosa	Canais radiculares Número	%
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	+	Anaeróbio	13	43,3
<i>Peptostreptococcus micros</i>	+	Anaeróbio	9	30,0
<i>Gemella morbilorum</i>	+	Facultativo	9	30,0
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	Anaeróbio	7	23,3
<i>Streptococcus constellatus</i>	+	Anaeróbio	6	20,0
<i>Streptococcus mitis</i>	+	Facultativo	6	20,0
<i>Gemella haemolysans</i>	+	Facultativo	4	13,3
<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	-	Anaeróbio	3	10,0
<i>Prevotella corporis</i>	-	Anaeróbio	3	10,0
<i>Veillonella spp.</i>	-	Anaeróbio	3	10,0
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	+	Anaeróbio	3	10,0
<i>Cardiobacterium hominis</i>	-	Facultativo	3	10,0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	Facultativo	3	10,0
<i>Prevotella loescheii</i>	-	Anaeróbio	2	06,6
<i>Eubacterium lentum</i>	+	Anaeróbio	2	06,6
<i>Bacteroides gracilis</i>	-	Anaeróbio	2	06,6
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+	Anaeróbio	2	06,6
<i>Peptostreptococcus spp.</i>	+	Anaeróbio	2	06,6
<i>Clostridium subterminale</i>	+	Anaeróbio	2	06,6
<i>Tissierella praeacuta</i>	-	Anaeróbio	2	06,6
<i>Streptococcus oralis</i>	+	Facultativo	2	06,6
<i>Streptococcus sanguis</i>	+	Facultativo	2	06,6
<i>Streptococcus anginosus</i>	+	Facultativo	2	06,6
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	Facultativo	2	06,6
<i>Prevotella buccae</i>	-	Anaeróbio	1	03,0
<i>Prevotella oris</i>	-	Anaeróbio	1	03,0
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Peptostreptococcus tetradius</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Bacteroides spp.</i>	-	Anaeróbio	1	03,0
<i>Actinomyces viscosus</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Eubacterium limosum</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Eubacterium aerofaciens</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Clostridium butyricum</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Clostridium hastiforme</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Streptococcus intermedius</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Lactobacillus minute</i>	+	Anaeróbio	1	03,0
<i>Actinomyces naeslundii</i>	+	Facultativo	1	03,0
<i>Lactobacillus lactis</i>	+	Facultativo	1	03,0
<i>Streptococcus acidominus</i>	+	Facultativo	1	03,0
<i>Streptococcus mutans</i>	+	Facultativo	1	03,0
<i>Enterococcus spp.</i>	+	Facultativo	1	03,0
<i>Enterococcus faecium</i>	+	Facultativo	1	03,0
<i>Lactobacillus spp.</i>	+	Facultativo	1	03,0
<i>Aerococcus viridans</i>	+	Facultativo	1	03,0
<i>Neisseria spp.</i>	-	Facultativo	1	03,0
<i>Capnocytophaga</i>	+	Facultativo	1	03,0
Total microrganismos			117	

Do total de 30 canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais investigados, 2 foram diagnosticados na fase intra-óssea; 5 na fase subperiosteal; 17 na fase submucosa, sendo 13 difusos e 4 localizados e, 6 na fase de fistulização, 5 com fístula intra-oral e 1 com fístula extra-oral (TABELA 9 e FIGURA 11).

TABELA 9- Frequência dos abscessos periapicais quanto a localização (n=30).

Classificação	Número	%
ABSCESSOS PERIAPICAIS		
ABSCESSOS INTRA-ORAIS		
SUPERIÓSTEO	05	16,6
SUBMUCOSO	17	56,6
Difuso	13	43,3
Localizado	04	13,3
FISTULIZAÇÃO		
Intra-oral	05	16,6
Extra-oral	01	03,3
INTRA-ÓSSEO	02	06,6
ABSCESSOS EXTRA-ORAIS		
Difuso	00	00,0
Localizado	00	00,0
Total	30	100

Houve correlação positiva entre abscesso submucoso localizado e *Peptostreptococcus anaerobius*; exsudato purulento e *Peptostreptococcus prevotii*; dor à percussão e *Bacteroides gracilis*; lesão periapical e *Eubacterium lentum*; edema e *Gemella* spp.; história prévia de dor e dor presente com as espécies *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguis*.

Encontrou-se a prevalência do abscesso submucoso difuso em 43,3% (13) dos casos investigados (**FIGURA 11**) e em 8 dos 13 casos a presença da espécie *Peptostreptococcus prevotii*, seguida de 4 casos com *Gemella morbillorum* e em 3 casos com a espécie *Fusobacterium necrophorum*, sugerindo correlação positiva entre abscesso submucoso difuso e as respectivas bactérias.

FIGURA 9- Representação gráfica da freqüência das bactérias Anaeróbias estritas, Anaeróbias facultativas, Gram-negativas e Gram-positivas.

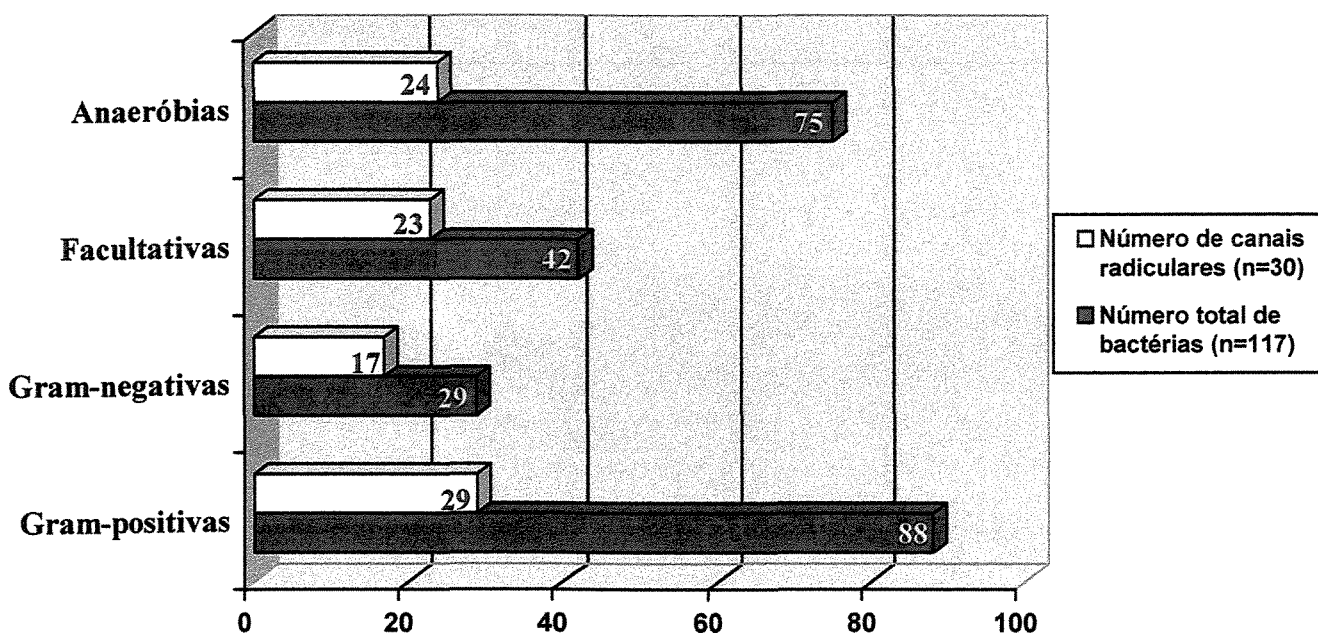


FIGURA 10 – Representação gráfica das espécies bacterianas prevalentes (%)
(n=117).

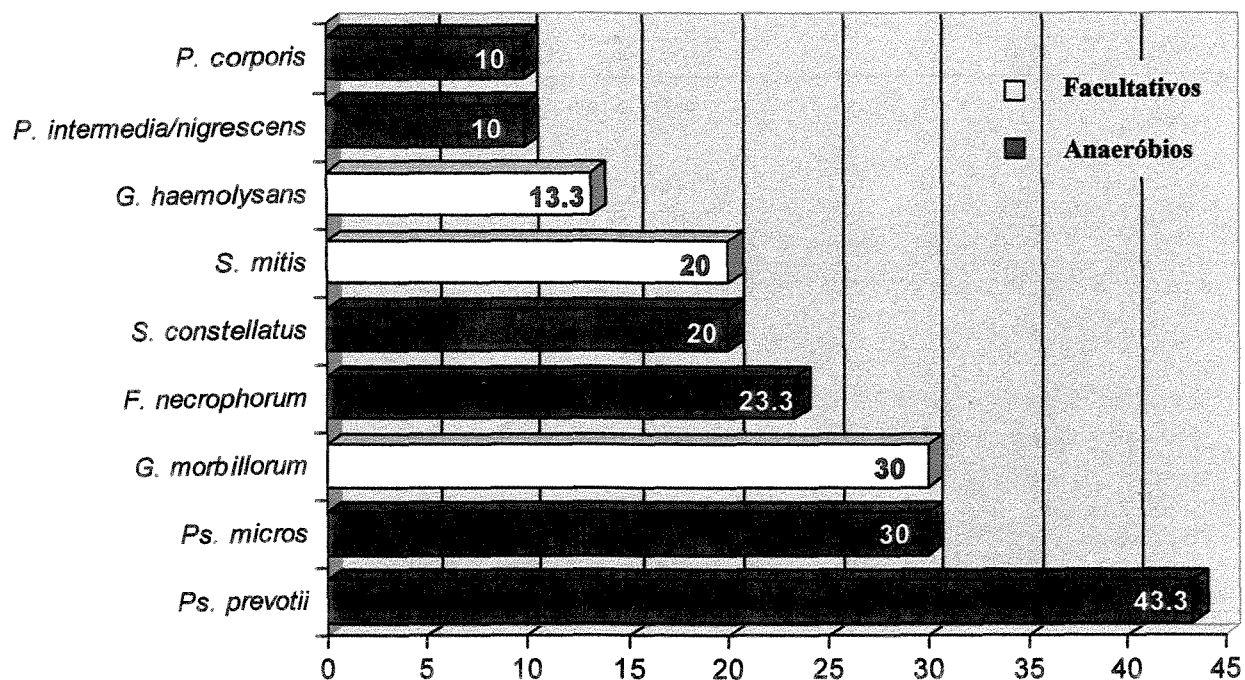
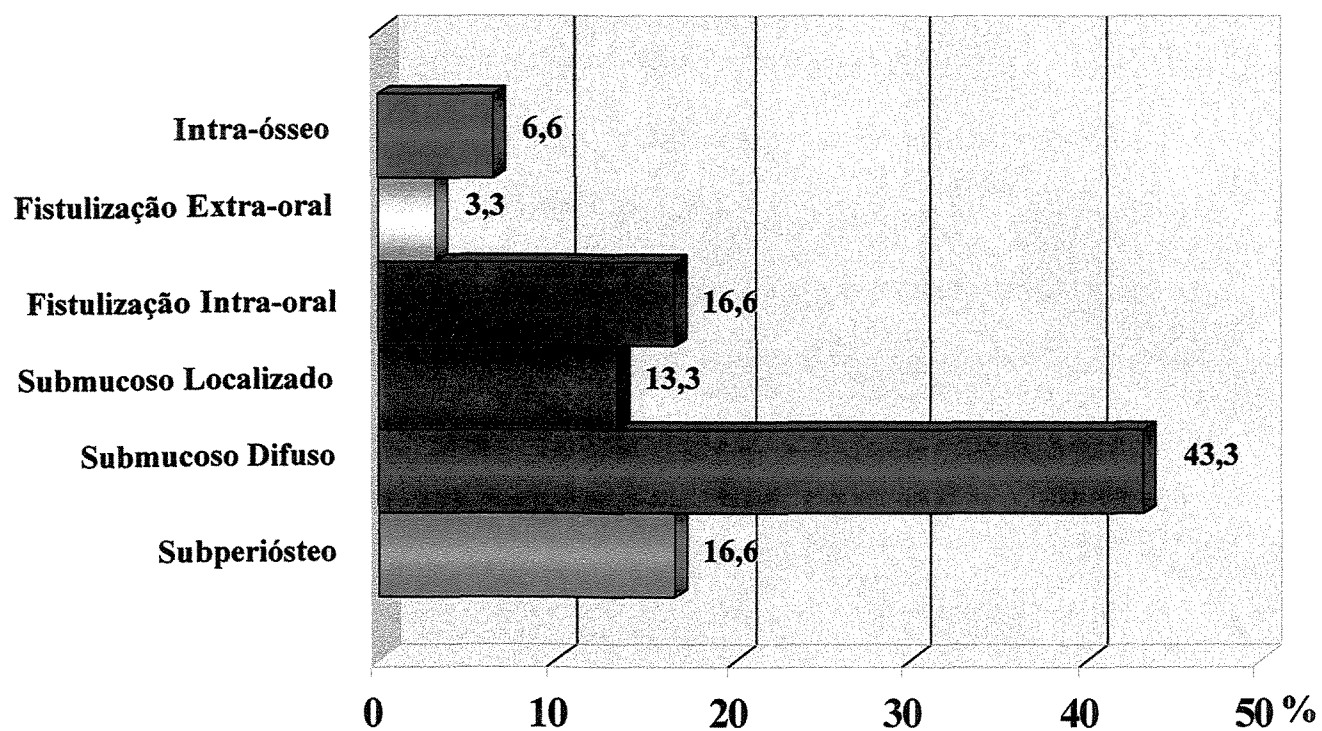


FIGURA 11 – Gráfico representativo das freqüências dos abscessos periapicais encontrados quanto a localização (n=30).



Diante destes resultados, as espécies anaeróbias estritas *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* foram testadas frente a diversos antibióticos utilizando o método do *E-test*. Quanto a suscetibilidade antimicrobiana, tais bactérias demonstraram serem sensíveis aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina.

Nas **TABELAS 10 e 11** podem ser observados os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antibióticos e a suscetibilidade antimicrobiana das espécies bacterianas testadas, respectivamente, baseadas nos valores interpretativos da NCCLS. As espécies estudadas apresentaram-se altamente sensíveis aos antibióticos testados, sendo que as CIMs foram obtidas através da leitura do ponto de completa inibição do crescimento bacteriano inclusive das subpopulações, como recomendado pelos fabricantes.

TABELA 10- Valores das concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) dos antibióticos testados frente as espécies bacterianas *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum*.

Microrganismos	Benzilpenicilina (PG)	Amoxicilina (AC)	Amoxicilina + Ácido Clavulânico (XL)	Metronidazol (MZ)	Clindamicina (CM)
<i>Ps. prevotii</i>	<0,016	0,094	0,047	0,047	0.125
<i>F. necrophorum</i>	<0,016	0,047	0,016	<0,016	0,047

TABELA 11- Suscetibilidade antimicrobiana das espécies bacterianas *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum*, baseadas nos valores interpretativos da NCCLS.

Microrganismos	Benzilpenicilina (PG)	Amoxicilina (AC)	Amoxicilina + Ácido Clavulânico (XL)	Metronidazol (MZ)	Clindamicina (CM)
<i>Ps. prevotii</i>	S	S	S	S	S
<i>F. necrophorum</i>	S	S	S	S	S

S=sensível; I=intermediário; R=resistente.

DISCUSSÃO

Durante o diagnóstico de um abscesso é muito importante determinar sua localização, pois irá orientar quanto ao tipo de tratamento a ser empregado (drenagem cirúrgica ou via canal). O diagnóstico é realizado de acordo com os aspectos clínicos e radiográficos do paciente, obtendo-se informações sobre dor e sensibilidade na palpação do fundo de sulco. No presente estudo, os 30 canais radiculares infectados investigados, estavam associados a abscessos periapicais, diagnosticados durante os exames objetivos e subjetivos.

Foram utilizados métodos microbiológicos envolvendo inoculação das amostras em meios de transporte e, em seguida, em meios de cultura pré-reduzidos altamente nutritivos, que foram prontamente incubadas por tempo prolongado sob condições gasosas adequadas, para evitar a perda de microrganismos de crescimento lento e identificar o maior número de espécies bacterianas possíveis, inclusive anaeróbias estritas.

O uso de meios de transporte preserva a viabilidade microbiana, inclusive dos anaeróbios, impedindo porém, sua proliferação (**TRONSTAD et al., 1987; GOMES, 1995**). Esta propriedade é importante, pois além de permitir contagem fiel do número de células presentes no material clínico, impede que espécies facultativas proliferem excessivamente, mascarando o crescimento, muito mais lento, de anaeróbios (**VAN STEENBERG et al., 1982**). Um meio de transporte bastante utilizado é o "Reduced Transport Fluid" (RTF), que é eficiente em manter

a viabilidade e a contagem original de células até 24h em temperatura ambiente. Outro meio encontrado é Viability Medium Goteborg Agar (VMGA III) também eficaz para o transporte, no entanto, em até 4h (**VAN STEENBERG et al., 1982**).

A inoculação direta da ponta de papel no meio de transporte Viability Medium Goteborg Agar (VMGA III) foi a nossa escolha. **DAHLÉN et al. (1993)** relataram que a recuperação de bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas pelo método de transporte fluido VMGA III foi melhor que o RTF, especialmente devido a consistência gel do VMGA III. Essa consistência gel, de acordo com esses autores, mantém baixo potencial *redox* durante o transporte. No estudo de **GOMES (1995)** discute-se que, com o desenvolvimento de técnicas anaeróbias, a recuperação de microrganismos da microbiota de canais radiculares através da amostragem em meios de transporte e cultivo tem resultados favoráveis. Em outros estudos, usando a técnica com meio de transporte para recuperar bactérias de canais radiculares (**YOSHIDA et al., 1987; WASFY et al., 1992**), alguns não obtiveram bactérias cultiváveis. Também, a direta inoculação da amostra da ponta de papel em meio sólido pré-reduzido, por vezes não é capaz de recuperar bactérias cultiváveis de alguns canais radiculares como relatado por **GOMES et al. (1994a, b)**.

Resultados negativos podem indicar ausência de bactérias, concentração insuficiente bacteriana para que ocorra o crescimento em meio de cultura ou falha na técnica microbiológica. Ainda assim, não pode ser esquecido que a técnica de coleta de amostras microbiológicas com pontas de papel absorvente, com suas limitações, é de muita ajuda, especialmente na escolha do antibiótico mais

indicado para casos específicos.

No presente estudo, em apenas um canal radicular avaliado não foi conseguido o cultivo de bactérias, podendo assim, indicar falha na técnica microbiológica ou número insuficiente de concentração microbiana.

O isolamento das bactérias em placas pré-reduzidas com meios seletivos auxiliaram na identificação de muitas espécies bacterianas anaeróbias. Em seguida, foi observada a reação de catalase, realizado o método de coloração de Gram para demonstrar os microrganismos predominantes e, finalizando, a identificação com a utilização dos “kits” comerciais.

O uso de “kits” comerciais para identificação pode não encontrar aprovação universal, mas evita problemas relacionados a variações interlaboratoriais. Também representa um sistema seguro, reproduzível e disponível para laboratórios relativamente não especializados, sendo um método acessível para análise microbiológica endodôntica (**GOMES, 1995**).

O presente estudo mostrou não somente que anaeróbios estritos são importantes componentes da microbiota de canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais, mas também, que anaeróbios específicos como *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium necrophorum* são caracteristicamente associados com este aspecto clínico, embora sem significância estatística.

GOMES et al. (1994a; 1996b) encontraram associação entre exsudato purulento e a presença de *Fusobacterium* spp. (especialmente *F. necrophorum*), *Prevotella loescheii*, *Bacteroides* spp. e *Streptococcus constellatus*. Em **1996a GOMES et al.**, também relataram associação entre a presença de exsudato purulento e a identificação de *Fusobacterium* spp..

Neste estudo, encontramos em 56,6% dos casos examinados (17 canais radiculares) a presença de *Peptostreptococcus* spp. e em 23,3% (7 canais radiculares) de *Fusobacterium* spp.. Estando de acordo com o trabalho de **ADERHOLD et al. (1981)** que estudaram a microbiota de 50 abscessos periapicais agudos e encontraram em 66% (33) dos casos, cocos anaeróbios Gram-positivos entre eles *P. anaerobius*, *P. prevotii*, *P. magnus* e *P. asaccharolyticus*. **LABRIOLA et al. (1983)** encontraram 277 microrganismos diferentes de 50 abscessos orofaciais, destes 22 eram cocos anaeróbios Gram-positivos (*P. anaerobius*, *P. prevotii*, *P. productus*, *P. magnus* e *P. asaccharolyticus*).

De acordo com **RAMS et al. (1992)** *Peptostreptococcus micros* que são cocos anaeróbios Gram-positivos, têm sido encontrados associados com abscessos endodônticos (**BROOK et al., 1981; YOSHIDA et al., 1987**). Esta espécie é capaz de aumentar a virulência de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas melaninogenica*, bastonetes entéricos, *Pseudomonas* e outras bactérias em infecções mistas experimentais realizadas em animais (**SUNDQVIST et al., 1979; BROOK, 1988**).

VAN DALEN et al. (1998) observaram que *P. micros* desenvolveu atividade sinérgica sobre a virulência dos microrganismos *Prevotella nigrescens* e principalmente *P. intermedia*.

Fatores de virulência de *Peptostreptococcus micros* inclui atividade enzimática proteolítica, elaboração de hialuronidase, produção de componentes sulfúricos voláteis de *L. cysteine* e, inibição de fibroblastos gengivais humanos e crescimento de célula epitelial (**GOMES, 1995**).

No presente estudo as bactérias anaeróbias mais freqüentemente isoladas foram *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium necrophorum*, *Streptococcus constellatus* e, dentre as anaeróbias facultativas, *Gemella morbillorum* e *Streptococcus mitis*. De acordo com os resultados deste estudo **OGUNTEBI et al. (1982)** examinando abscessos periapicais agudos, encontraram mais freqüentemente as espécies *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mitis*. **SABISTON & GOLD (1974)** verificaram que *Fusobacterium nucleatum* foi a espécie com maior ocorrência, estando presente em 7 de 8 abscessos investigados e sendo a maior espécie constituinte da infecção em 5 dos 8 casos. Em estudo similar, **SABISTON et al. (1976)**, de um total de 65 casos de abscessos dentais, relataram que 69% das espécies isoladas foram bastonetes anaeróbios Gram-negativos (24% sendo *Fusobacterium nucleatum*) e 48,3% cocos anaeróbios Gram-positivos (22,4% sendo *Peptostreptococcus micros*, 15,5% *P. anaerobius* e 3,4% *P. magnus*). Resultado semelhante foi encontrado por **WILLIAMS et al. (1983)** que investigando 10 casos com

abscessos agudos observaram a maior frequência das espécies *Fusobacterium nucleatum* em 60% casos e em 14,8% dos isolados, *Peptostreptococcus micros* em 50% dos casos e em 17,7 % dos isolados e *P. anaerobius* em 10% dos casos e em 2,7% dos isolados.

Outras espécies de *Peptostreptococcus* foram encontradas em no presente estudo tais como, *P. anaerobius* em 6,6% dos casos, *P. magnus*, *P. tetradius* e *P. asaccharolyticus* todas em 3,3%. Embora a literatura destaque mais a presença da espécie *Peptostreptococcus micros* nas análises microbiológicas de abscessos periapicais, nossos resultados mostram maior prevalência da espécie bacteriana *Peptostreptococcus prevotii* em 43,3% dos casos investigados (13 canais radiculares).

Neste estudo, a espécie bacteriana *Gemella morbillorum* foi encontrada em 30% dos casos (9 canais radiculares), similar a **WASFY et al. (1992)** que encontraram este isolado como um dos mais freqüentes, em 47,4% dos casos analisados. Estes autores agruparam esta espécie com as anaeróbias, similar aos estudos de **KANTZ & HENRY (1974)** e **SABISTON et al. (1976)**, embora estes últimos, cite que *Gemella morbillorum* é uma espécie aerotolerante, como classificada por **MORSE (1987)**; **SUNDQVIST et al. (1992b)**; **GOMES (1995)** e também no presente estudo.

Streptococcus constellatus foi também uma das espécies bacterianas mais encontradas em neste estudo, presente em 20% dos casos investigados (6 canais

radiculares). Outros autores (**SABISTON et al., 1976; KULEKÇI et al., 1996; GOMES et al., 1996a,b**) também encontraram esta espécie embora em menor prevalência.

Outras espécies de *Streptococcus* foram encontradas no presente estudo, tais como *S. mitis* (20%), *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. anginosus* todas (6,6%) e *S. intermedius*, *S. acidominus* e *S. mutans* todas (3,3%). Em estudos anteriores (**SABISTON et al., 1976; OGUNTEBI et al., 1982; WILLIANS et al., 1983**), as espécies *S. mitis* e *S. sanguis* foram encontradas predominantemente em casos de abscessos endodônticos. **WASFY et al. (1992)** encontraram *S. mitis* em 8,9% (7 canais radiculares) de 78 casos estudados.

A presença das bactérias pigmentadas de preto também foi investigada. *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Prevotella corporis* foram isoladas em 10% dos casos (3 canais radiculares) e *Prevotella loescheii*, em 6,6% dos casos (2 canais radiculares), embora *Porphyromonas* spp. não tenham sido encontradas. **GOMES et al. (1995)** comparou a inoculação direta sobre meio sólido das amostras bacterianas de *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis* através de pontas de papel absorvente, com a inoculação das pontas no meio de transporte (RTF) e observando que o primeiro método (colocação direta das pontas de papel em meio sólido) permitiu recuperar maior número desses microrganismos. Em nosso estudo, como já citado, utilizamos o meio de transporte VMGA III para o transporte das bactérias até o laboratório de microbiologia, existindo a possibilidade de perda de espécie bacteriana. **GOMES**

et al. (1995) afirmam que é necessário o mínimo de concentração desses microrganismos para o seu isolamento, e por conseqüência, para o seu reconhecimento na situação clínica. **GOMES (1995)** pressupõe que se *Porphyromonas* spp. estão presentes em baixa concentração, será difícil detectar sua presença pelo uso de métodos de cultura. Afirmam, que falhas no crescimento de tais microrganismos não estão associadas com a falta de condições anaeróbias, outros fatores também podem existir.

Os resultados do presente estudo estão em desacordo com os trabalhos de **WASFY et al. (1992)** que identificaram bactérias pigmentadas de preto em 56,5% das coletas de canais radiculares infectados, dos quais 39,7% eram *Prevotella intermedia*. Entretanto, os estudos de **OGUNTEBI et al. (1982)**; **WILLIAMS et al. (1983)**; **LABRIOLA et al. (1983)** as bactérias pigmentadas de preto foram encontradas menos freqüentemente estando compatível com os resultados deste estudo. **VAN WINKELHOFF et al. (1985)** admitem a dificuldade em isolar estas espécies bacterianas.

BAUMGARTNER et al. (1996) observaram que 83% dos isolados bacterianos analisados dos canais radiculares com lesões periapicais eram anaeróbios. Dos 43 canais radiculares analisados, 23 apresentaram anaeróbios pigmentados de preto: 3 com *Prevotella intermedia*, 13 com *P. nigrescens*, 5 com *P. melaninogenica*, 4 com *Porphyromonas gingivalis* e 1 com *P. endodontalis*. Também foram encontradas *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus morbillorum* e não pigmentadas *Prevotella oralis*.

No estudo de **BROOK et al. (1981)** analisando abscessos periapicais de crianças, encontraram bactérias anaeróbias em todos os espécimes observados. No total de 53 isolados bacterianos, 20 eram *Bacteroides* spp. incluindo 9 “*Bacteroides melaninogenicus*”, 3 “*Bacteroides oralis*” e 3 “*Bacteroides corrodens*”; 5 *Fusobacterium* spp., 17 eram cocos Gram-positivos anaeróbios entre eles 3 *Peptococcus constellatus*, 4 *Peptostreptococcus micros* e 7 eram bacilos Gram-positivos anaeróbios sendo 3 *Actinomyces* spp. e 3 *Lactobacillus* spp..

Em 1999, **BAUMGARTNER et al.**, analisaram 40 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e periodontite apical. Destes, 17 apresentaram exsudato purulento dos quais 9 foram encontradas bactérias pigmentadas de preto (*Prevotella nigrescens* em 6 dos 9 casos e *Prevotella intermedia* em 3 dos 9 casos).

No trabalho de **HASHIOKA et al. (1992)** observaram correlação positiva das bactérias *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium lentum*, *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis*, *Bacteroides* spp. e canais radiculares com exsudato purulento independente da presença de dor espontânea ou provocada.

KULEKÇI et al. (1996) investigando a bacteriologia de abscessos dento-alveolares agudos de pacientes que já haviam recebido terapia antibiótica empírica antes do tratamento endodôntico, observaram a predominância de

Prevotella spp. (25,7%), *Peptostreptococcus* spp. (17,1%) e *Streptococcus* spp. (14,2%), mostrando a natureza polimicrobiana dos abscessos dento-alveolares agudos, bem como o papel predominante das bactérias anaeróbias.

Em 30 canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais analisados no presente estudo, um apresentou cultura negativa e, dos 29 canais radiculares restantes, foi isolado de 1 a 10 espécies bacterianas.

Na suposição de que a microbiota de dentes associados a abscessos periapicais deva conter uma quantidade mínima de espécies necessárias para produzir doença, a média de espécie bacteriana encontrada por canal radicular em nosso estudo foi 3,9. Nossos resultados foram compatíveis com os estudos de **OGUNTEBI et al. (1982)**; **WASFY et al. (1992)**; **ADERHOLD et al. (1981)**; **SABISTON et al. (1976)** que relataram valores de 2,5; 3,1; 3,6 e 3,8 respectivamente. **WILLIAMS et al. (1983)** e **BROOK et al. (1981)** relataram relativamente valores mais altos de 4,5 e 4,9, respectivamente.

Em 2 casos ocorreram a presença de abscesso periapical em dentes intactos sem evidência de cárie ou doença periodontal e, com polpa necrótica determinado pelos testes de sensibilidade térmica. As bactérias encontradas foram *P. prevotii*, *F. necrophorum* *S. constellatus* e *P. micros* em um dos casos, e no outro, *P. prevotii*, *F. necrophorum* *S. constellatus*, *P. anaerobius* e *Gemella morbillorum*, caracterizando presença de microbiota mista anaeróbia. **WASFY et al., 1992** avaliaram a microbiota de 78 canais radiculares de dentes intactos com

polpa necrótica associadas a infecções periapicais. Os isolados mais freqüentemente encontrados nesta população foram *Eubacterium lentum* (51,3%), "*Streptococcus morbillorum*" (47,4%), "*Bacteroides intermedius*" (39,7%) e *Bacteroides ureolyticus* (28,2%). *Fusobacterium* spp. foram encontradas em (20,5%) e *Peptostreptococcus* spp. em (9,0%) dos casos.

KANTZ & HENRY (1974) identificaram a microbiota de 16 canais radiculares de dentes intactos com polpas não vitais. De 377 microrganismos isolados, verificaram uma variedade de anaeróbios como *Actinomyces israelii*, *Actinomyces* spp., *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Campylobacter sporum*, *Eubacterium alactolyticum*, *Fusobacterium fusiforme*, *Fusobacterium varium*, "*Peptococcus morbillorum*", *Propionibacterium acnes*, *Veillonella parvula* sendo que *Fusobacterium* spp. com 41 isolados a espécie mais freqüente, e com menor prevalência, 7 isolados de "*Peptococcus morbillorum*".

Bacteroides spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Fusobacterium* spp. dominaram os isolados anaeróbios no estudo de 54 culturas positivas de dentes traumatizados realizado por **BERGENHOLTZ (1974)**. Este autor afirma que a existência de tecido necrótico aumenta o potencial de risco para posterior infecção e complicações periapicais.

CSERNYEI (1939) em um estudo sobre o efeito anacorético de inflamações periapicais crônicas, afirma que estas sofrem efeito anacorético por microrganismos e, que estes não permanecem no sangue, mas refugiam-se na

área de inflamação. Exemplifica a formação de abscesso de dentes traumatizados com polpa necrótica, afirmando que esta produz alteração de metabolismo nos tecidos periapicais que respondem com inflamação. O tecido inflamado atrai microrganismos piogênicos, resultando no abscesso.

As diferenças na frequência de isolamento microbiano de um estudo para outro, se dá provavelmente devido a um grande número de variáveis que incluem a técnica de coleta de amostras, o meio de transporte utilizado, o meio de cultura e os métodos de incubação e identificação. Podendo ser também devido as diferentes quantidades de amostras investigadas em cada estudo e/ou estágio da infecção.

A lista de microrganismos identificados está na **Tabela 8**, sendo compatível com os encontrados na literatura consultada. Portanto, nossos resultados sugerem que a técnica de coleta bacteriana empregada com isolamento absoluto do dente e desinfecção com hipoclorito de sódio foi efetivo no controle de contaminantes no campo operatório.

É importante que estes dados sejam obtidos periodicamente, para monitorar possíveis mudanças nos tipos de microrganismos responsáveis pela formação de abscessos periapicais.

A seleção de métodos para teste de suscetibilidade de anaeróbios estritos tem apresentado grandes dificuldades. Métodos desenvolvidos para

microrganismos de crescimento rápido, como aeróbios, tentaram ser adaptados as necessidades dos anaeróbios estritos, mas mostraram problemas na padronização e não conseguiram reproduzir resultados fiéis (**WEXLER, 1993**).

Segundo **DUERDEN (1995)** essas dificuldades são geradas por várias razões: os anaeróbios tendem a crescer mais lentamente que muitos aeróbios e mesmo anaeróbios facultativos; e o equilíbrio entre o efeito do antimicrobiano, crescimento bacteriano, e a degradação do antibiótico podem variar muito mais para os anaeróbios. Essas características afetam principalmente os resultados dos teste de suscetibilidade com disco. Muitos anaeróbios estritos necessitam de meios mais enriquecidos (vitamina K e hemina), que aqueles usados para os testes de aeróbios. Os meios de cultura são mais difíceis de serem padronizados, e podem ocorrer interações entre os componentes do meio, por exemplo o sangue e o antibiótico. A presença da fermentação de meios enriquecidos pode levar a uma significativa queda no pH do meio durante a incubação e, conseqüentemente, alterar os resultados dos antibióticos sensíveis ao pH. Muitos anaeróbios necessitam de CO₂ e, por isso, todas as misturas padrões de gás para anaeróbios contém CO₂ , fazendo com que haja mais redução do pH do meio. Outra razão é que alguns anaeróbios estritos não crescem adequadamente em pequenas concentrações nos inóculos (padrões recomendados para testes de suscetibilidade), assim, o crescimento dessas espécies bacterianas pode ser inadequado, dificultando a obtenção dos resultados. Testes de suscetibilidade com discos não são recomendados pela NCCLS para anaeróbios de crescimento lento. Os métodos recomendados são baseados em diluição em ágar,

microdiluição em caldo ou macrodiluição. Alguns desses métodos não têm sido inteiramente satisfatórios e não são apropriados para testes de isolados clínicos individuais.

A alternativa utilizada está sendo o “Epsilometer test” (*E-test*) que oferece a possibilidade de teste de suscetibilidade e determinação da concentração inibitória mínima para isolados individuais (DUERDEN, 1995). CITRON et al. (1991) afirmaram que o *E-test* constitui-se de um método confiável para teste de suscetibilidade, tanto de bactérias anaeróbias de crescimento rápido, quanto àquelas de crescimento mais lento.

BOLMSTRON (1993) relata que os testes baseados em gradiente de concentração de antibiótico pode ser realizado e reproduzido, somente se este gradiente estiver bem definido e permanecer estável durante o período de tempo crítico de crescimento dos microrganismos a serem testados. O tempo crítico para o crescimento das bactérias anaeróbias podem variar de 5 a 12 horas. A autora ainda afirma que o *E-test* apresenta um gradiente de concentração do antibiótico bem definido, cobrindo 15 níveis de diluições e quando colocado sobre o ágar, este se mantém estável por no mínimo 12 horas, tempo crítico do início do crescimento da maioria das bactérias anaeróbias estritas.

O meio de cultura escolhido neste estudo foi o Brucella ágar + 5% de sangue de carneiro desfibrinado, suplementado com vitamina K e hemina para melhores condições de crescimento das bactérias anaeróbias estritas, produzindo

CIMs consistentes e compatíveis com a literatura. CITRON et al. (1991) observaram menores discrepâncias nas CIMs dos antibióticos testados quando utilizaram o Brucella ágar como meio de cultura para as bactérias, quando compararam com o “Wilkins-Chalgren” ágar. BOLMSTRÖM (1993) também utilizaram Brucella ágar suplementado com vitamina K e hemina e observaram bom crescimento bacteriano e resultados consistentes de CIMs.

As espécies de *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* foram testadas contra os antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina, mostrando alta sensibilidade a todas as drogas. A azitromicina e eritromicina não forneceram resultados confiáveis através do método do *E-test*, pois as CIMs desses antibióticos para as bactérias anaeróbias estritas não foram ainda determinadas pela NCCLS (NCCLS – M100 S8/M11 A4, 1997; VIGIL et al., 1997). Contudo, observamos a total resistência da espécie *Fusobacterium necrophorum* à eritromicina, mostrando crescimento da bactéria por toda a placa e CIM de 0,75 µg/mL para a espécie *Peptostreptococcus prevotii*. A azitromicina apresentou a CIM de 4 µg/mL para a espécie *Fusobacterium necrophorum* e de 0,75 µg/mL para a *Peptostreptococcus prevotii*.

Esses resultados coincidem com os achados de YAMAMOTO et al. (1989) que verificaram alta sensibilidade de 60 espécies de *Peptostreptococcus* isoladas de canais radiculares com periodontites apicais agudas, quando testadas contra as drogas penicilina, tetraciclina, eritromicina e gentamicina, afirmando que as

penicilinas são as drogas indicadas, quando necessárias, como suporte ao tratamento de canais radiculares com periodontite periapical aguda. Porém, **HUNT & MEYER (1983)** detectaram o aparecimento de resistência entre espécies de *Peptostreptococcus*, verificando que aproximadamente 15 % das espécies isoladas eram resistentes a penicilina e ampicilina, contradizendo o estudo de **HUNT et al. (1978)** no qual observaram, que as espécies de *Peptostreptococcus* não apresentaram resistência aos antibióticos testados (ampicilina, cefalotina, eritromicina e penicilina). Também observaram que em 31 espécies testadas, 16 mostraram resistência a eritromicina.

MATUSOW (1981) observaram que os *Peptostreptococcus* spp. apresentaram sensibilidade aos seguintes antibióticos: tetraciclina, eritromicina, penicilina, clindamicina e ampicilina. As espécies *Fusobacterium* mostraram-se sensíveis a tetraciclina, penicilina, clindamicina e ampicilina, sendo que para a eritromicina de 4 espécies testadas 2 apresentaram-se sensíveis e 2 resistentes.

APPELBAUM et al. (1990) estudaram a correlação entre a produção de beta-lactamases com a atividade antimicrobiana da amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitin, imipenen e metronidazol contra 320 espécies do gênero *Bacteroides* não pertencentes ao grupo dos *Bacteroides fragilis* (neste grupo os autores incluem as espécies de "*Bacteroides*" pigmentadas de preto, atualmente denominadas de *Prevotella* e *Porphyromonas*) e 129 espécies do gênero *Fusobacterium*. Observaram que 64,7% das espécies do gênero "*Bacteroides*" e 41,1% do *Fusobacterium* eram beta-lactamases positivas. Os

autores afirmam que o ácido clavulânico aumentou significativamente a atividade antimicrobiana da amoxicilina, pois em 45,9% das espécies produtoras de beta-lactamases apresentaram-se sensíveis *in vitro* a droga amoxicilina. Com a associação da amoxicilina ao ácido clavulânico, 90,4% das bactérias apresentaram-se suscetíveis. Concluíram que, embora a resistência às penicilinas tenha aumentado entre as espécies estudadas, as penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamases continuam altamente efetivas contra estas bactérias.

Em 1992, APPELBAUM et al., avaliando a suscetibilidade de 540 espécies de bacilos anaeróbios Gram-negativos incluindo *Fusobacterium* spp. frente os antibióticos amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, temafloxacin e clindamicina apresentaram-se sensíveis.

CULLMANN et al. (1993) estudando a suscetibilidade de bactérias anaeróbias, relataram que a eritromicina não foi eficaz contra os anaeróbios Gram-negativos dentre eles *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium* spp. Observaram que até mesmo algumas espécies Gram-positivas apresentaram resistência, entre elas *Peptostreptococcus* spp..

Segundo WALKER (1992), a eritromicina tem sido ineficaz contra a maioria das bactérias Gram-negativas, devido sua incapacidade de penetrar no complexo membrana externa-parede celular.

De acordo com FASS (1993), a azitromicina tem boa ação contra as

bactérias 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 bactérias Gram-positivas. O autor observou que, embora atividade antibacteriana dessas drogas variasse entre microrganismos, como regra geral, as bactérias sensíveis à azitromicina também eram sensíveis à eritromicina, o que foi também observado quanto à resistência, com exceção do *Fusobacterium* spp., que se apresentaram sensíveis somente a azitromicina.

CITRON et al. (1991) compararam as concentrações inibitórias mínimas determinadas pelos métodos do *E-test* e diluição em ágar utilizando 105 espécies de bactérias anaeróbias dentre elas, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*, isoladas clinicamente contra diversos antibióticos entre eles penicilina, metronidazol e clindamicina. Observaram que as espécies *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* apresentaram-se sensíveis aos antibióticos testados.

O método do *E-test* foi escolhido para o presente estudo, devido a dois critérios principais: por apresentar boa correlação com o método referente recomendado pela NCCLS (diluição em meio sólido) e, por ser um método simples, rápido e capaz de reproduzir resultados adequados durante o estudo de bactérias anaeróbias estritas (**CITRON et al., 1991**).

Com os resultados obtidos neste estudo e confrontando-os com a

literatura, podemos concluir que há presença de microbiota mista com predominância de bactérias anaeróbias Gram-positivas nos canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais, com a espécie *Peptostreptococcus prevotii* como a mais representativa das bactérias encontradas.

Classificou-se os abscessos periapicais quanto a localização e o abscesso periapical submucoso difuso foi o mais encontrado em 13 (43,3%) dos casos investigados, sendo que nestes casos, em 8 houve a presença da espécie *Peptostreptococcus prevotii*, seguida de 4 casos com *Gemella morbillorum* e em 3 casos com a espécie *Fusobacterium necrophorum* (**FIGURA 11**), sugerindo correlação positiva entre abscesso submucoso difuso e as respectivas bactérias.

Diante destes resultados as espécies bacterianas anaeróbias estritas *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* foram testadas através do *E-test* e apresentaram-se altamente sensíveis aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina. Logo, em pacientes em condições de risco de desenvolvimento da endocardite bacteriana ou quando indicada a terapia antibiótica durante o tratamento de pacientes com abscessos periapicais, estes antibióticos são recomendados. Os resultados deste trabalho estão de acordo com o estudo de **DAJANI et al. (1997)** onde a escolha da amoxicilina deve ser a primeira opção entre as drogas terapêuticas.

O uso indiscriminado de antibióticos para complementar tratamentos odontológicos deve ser evitado pois, pode levar a sérias consequências incluindo reações alérgicas às drogas usadas, desenvolvimento de superinfecções com espécies bacterianas resistentes e exposição desnecessária de pacientes a certas toxicidades e efeitos colaterais dos medicamentos **(FOUAD et al., 1996)**.

Novas pesquisas, são necessárias para o maior conhecimento do padrão de suscetibilidade das bactérias associadas a abscessos periapicais.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, nas condições experimentais deste estudo, pode-se concluir que:

1- Os resultados encontrados indicam presença de microbiota mista com predominância de bactérias anaeróbias Gram-positivas em canais radiculares de dentes associados a abscessos periapicais.

2- Houve relações positivas entre a presença abscessos periapicais e certas bactérias:

2.1- Encontrou-se a prevalência do abscesso submucoso difuso em 43,3% (13) dos casos investigados e em 8 dos 13 casos a presença da espécie *Peptostreptococcus prevotii*, seguida de 4 casos com *Gemella morbillorum* e em 3 casos com a espécie *Fusobacterium necrophorum*, sugerindo correlação positiva entre abscesso submucoso difuso e as respectivas bactérias.

2.2- abscesso submucoso localizado e presença *Peptostreptococcus anaerobius*.

3- Houve relações positivas entre alguns sinais e sintomas e a presença de determinadas bactérias:

3.1-Exsudato purulento e *Peptostreptococcus prevotii*;

3.2-Edema e *Gemella* spp..

3.3-Lesão periapical e *Eubacterium lentum*;

3.4-Dor à percussão e *Bacteroides gracilis*;

3.5-História prévia de dor e dor presente com as espécies *Peptostreptococcus anaerobius*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus sanguis*.

4- As espécies *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* estudadas, apresentaram-se sensíveis à benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT P.V., HUME W.R., PEARMAN J.W. (1990) Antibiotics and endodontics. *Australian Dental Journal*, 35, 50-60.

ABU-FANAS S.H., DRUCKER D.B., HULL P.S., GANGULI L. A. (1991) Identification, and susceptibility to seven antimicrobial agents, of 61 Gram-negative anaerobic rods from periodontal pockets. *Journal Dental*, 19, 46-50.

ADERHOLD L., KNOTHE H., FRENKEL G. (1981) The bacteriology of dentogenous pyogenic infections. *Oral Surgery*, 52, 583-587.

ANDRADE E.D., PASSERI L.A ., MATTOS FILHO T.R. (1998) Prevenção da endocardite bacteriana – Novas recomendações da American Heart Association. *Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas*, 52, 353-357.

APPELBAUM P.C., SPANGLER S.K., JACOBS M.R. (1990) β -Lactamase production and susceptibilities to amoxicilin, amoxicilin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis Bacteroides* isolates and 129 *Fusobacteria* from 28 U.S. Centers. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 34, 1546-1550.

- APPELBAUM P.C., SPANGLER S.K., SHIMAN R., JACOBS M.R. (1992) Susceptibilities of 540 anaerobic Gram-negative bacilli to amoxicillin, amoxicillin-BRL 42715, amoxicillin-clavulanate, temafloxacin, and clindamycin. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 36, 1140-1143.
- BAKER P.J., EVANS R.T., SLOTS J., GENCO R.J. (1984) Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. *Journal Dental Research*, 64, 1233-1244.
- BARNARD D., DAVIES J., FIGDOR D. (1996) Susceptibilities of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 29, 320-326.
- BAUMGARTNER J.C. & FALKLER W.A. (1991) Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *Journal of Endodontics*, 17, 380-383.
- BAUMGARTNER J.C., WATKINS B.J., BAE K.S. (1996) Identification of bacterial species in root canal infections. *Journal of Endodontics*, 22, 200.
- BAUMGARTNER J.C., WATKINS B.J., BAE K-S., XIA T. (1999) Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 25, 413-415.

- BENDER I.B., SELTZER S. & TURKENKOPF S. (1964) To culture or not to culture? *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 18, 527-540.
- BERG J-O & NORD C-E. (1973) A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scandinavian Journal Dental Research*, 81, 163-166.
- BERGENHOLTZ G. (1974) Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontologisk Revy*, 25, 347-358.
- BERGENHOLTZ G. (1981) Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *Journal of Endodontics*, 7, 100-104.
- BOLMSTRÖM A . (1993) Susceptibility testing of anaerobes with *E-test*. *Clinical infectious Disease* 16 (supplement 4), S367-370.
- BROOK I, GRIMM S., KIELICH R.B. (1981) Bacteriology of acute periapical abscess in children. *Journal of Endodontics*, 7, 378-380.
- BROOK I. (1988) Effect of *Streptococcus faecalis* on the growth of *Bacteroides* species and anaerobic cocci in mixed infection. *Surgery*, 103, 107-110.
- BROWN D. F. (1992) The *E-test* challenged with select strains. *Diagnostic and Microbiology Infectiuos Disease*, 15, 465-468.

- BYSTRÖM A. & SUNDQVIST G. (1983) Bacteriological evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 55, 307-312.
- CHAMBERS H.F. & SANDE M.A. (1995) Antimicrobial agents. In: Hardman J.G., Gilman A .G., Limbird L.E. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th edn. U.S., 1032-1141.
- CITRON D.M., OSTAVARI M.I., KARLSSON A., GOLDSTEIN E.J.C. (1991) Evaluation of the *E-test* for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 2197-2203.
- COHEN S. & BURNS R.C. (1998) *Pathways of the pulp*. 7th edn. St. Louis, Mosby, USA: C.V. Mosby Co.
- CONSOLARO A. & RIBEIRO F.C. (1998) Periapicopatias: Etiopatogenia e inter-relações dos aspectos clínicos, radiográficos e microscópicos e suas implicações terapêuticas. In: LEONARDO M.R. & LEAL J.M. *Endodontia-Tratamento de canais radiculares*. 3^a ed. São Paulo, Panamericana.
- CONTI R. (1997) Análise fenotípica da suscetibilidade antimicrobiana de cepas de bactérias pigmentadas isoladas da cavidade bucal. Tese de Mestrado. São Paulo: Universidade de São Paulo-USP.

- COOLIDGE E.D. (1919) The diagnosis and treatment of conditions resulting from dental pulps. *Journal of the National Dental Association*, 6, 377-349.
- CSERNYEI J. (1939) Anacoric effect of chronic periapical inflammations. *Journal of Dental Research*, 18, 527-531.
- CULMAN W., FREI R., KRECH T. (1993) Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. *Chemotherapy*, 39, 169-174.
- CVEK M. (1978) A clinical reports on partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fracture. *Journal of Endodontics*, 4, 232-237.
- DAHLÉN G., PIPATTANAGOVIT P., ROSLING B., MÖLLER A.J.R. (1993) A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 8, 375-382.
- DAJANI A.S., TAUBERT K.A., WILSON W., BOLGER A.F., BAYER A., FERRIERE P., GEWITZ M.H., SHULMAN S., NOURI S., NEWBURGER J.W., HUTTO C., PALLASH T.J., GAGE T.W., LEVISON M.E., 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 G.J., OLSEN I., TRONSTAD L. (1995) Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endodontic and Dental Traumatology*, 11, 142-149.
- DE DEUS Q.D. (1992) *Endodontia*. 5ª ed. Rio de Janeiro, Medsi.
- DONGARI A . & LAMBRIANIDIS T. (1988) Periodontally derived pulp lesions. *Endodontic and Dental Traumatology*, 4, 49-54.
- DUERDEN B.I. (1995) Role of the reference laboratory in susceptibility testing of anaerobes and a survey of isolates referred from laboratories in England and Wales during 1993-1994. *Clinical Infectious Disease*, 20 (Supl. 2), S180-S186.
- FABRICIUS L., DAHLÉN G., HOLM S.E., MÖLLER A.J.R. (1982) Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal Dental Research*, 90, 200-206.
- FASS R.J. (1993) Erythromycin, clarithromycin, and azitromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. *Antimicrobial and Agents Chemotherapy*, 37, 2080-2086.
- FINEGOLD S.M. (1977) Anaerobic bacteria in human disease. *Academic press*. New York, 534-537.

FINEGOLD S.M. & NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS WORKING GROUP ON ANAEROBIC SUSCEPTIBILITY TESTING (1988) Susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 1253-1256.

FORBES B.A ., SAHM D.F., WEISSFELD A .S. (1998) *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10th edn. St. Louis, M.O, USA: Mosby, 1079.

FOUAD A .F., RIVERA E.M., WALTON R.E. (1996) Penicillin as a supplement in resolving the localized acute apical abscess. *Oral Surgery, Oral medicine and Oral Pathology*, 81, 1996.

GOMES B.P.F.A., DRUCKER D.B. and LILLEY J.D. (1994a) Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *International Endodontic Journal*, 27, 291-298.

GOMES B.P.F.A., DRUCKER D.B. and LILLEY J.D. (1994b) Positive and negative associations in dental root canals. *Microbios*, 80, 231-243.

GOMES B.P.F.A. (1995) An investigation into the root canal microflora. PhD thesis. University of Manchester, UK.

- GOMES B.P.F.A., DRUCKER D.B. and LILLEY J.D. (1995) Recovery of *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis* by two different sampling techniques. *Journal Dental Research*, 74, 848.
- GOMES B.P.F.A., LILLEY J.D and DRUCKER D.B. (1996a) Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal*, 29, 69-75.
- GOMES B.P.F.A., LILLEY J.D and DRUCKER D.B. (1996b) Clinical significance of dental root canal microflora. *Journal of Dentistry*, 24, 47-55.
- GRAD H.A . (1997) Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan*, 90, 64-72.
- HAAPASALO M, RANTA K., RANTA H.(1987) Mixed anaerobic periapical infection with sinus tract. *Endodontic and Dental Traumatology*, 3, 83-85.
- HAAPASALO M. (1989) *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Endodontic and Dental Traumatology*, 5, 1-10.
- HARRISON J. W. (1999) Antibiotics not always necessary. *Journal of the American Dental Association*, 130, 782.

HASHIOKA K., YAMASAKI M., NAKANE A., HORIBA N., NAKAMURA H. (1992)

The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *Journal of Endodontics*, 18, 558-561.

HUNT D.E., KING T.J., FULLER G.E. (1978) Antibiotic susceptibility isolated from oral infections. *Journal of Oral Surgery*, 36, 527-529.

HUNT D.E. & MEYER R.A. (1983) Continued evolution of the microbiology of oral infections. *Journal of the American Dental Association*, 107, 52-54.

JANSEN J.E. & BREMMELGAARD A. (1991) susceptibility testing of anaerobic bacteria. *APMIS.*, 99, 711-720.

KAKEHASHI S., STANLEY HR, FIZGERALD. (1965) The effect of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 20, 340-349.

KANTZ W.E. & HENRY C.A . (1974) Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non –vital teeth in man. *Archives of Oral Biology*, 19, 91-96.

KORZEN B.H., KRAKOW A .A ., GREEN D.B. (1974) Pulpal and periapical tissue responses in conventional and monoinfected gnotobiotic rats. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 37, 783-802.

- KÜLEKÇİ G., INAC D., KOCAK H., KAPOGLU C., GUMRU O.Z. (1996) Bacteriology of dentoalveolar abscesses in patients who have received empirical antibiotic therapy. *Clinical Infectious Disease*, 23, (Suppl 1), 51-53.
- LABRIOLA J.D., MASCARO J., ALPERT B. (1983) The microbiologic flora of orofacial abscesses. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 41, 711-714.
- 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 M.A.O., MACFARLANE T.W., MCGOWAN D.A. (1986) Quantitative bacteriology of acute dental alveolar abscesses. *Journal of the Medicine Microbiology*, 21, 101-104.
- LEWIS M.A.O., MACFARLANE T.W., MCGOWAN D.A., MACDONALD D.G. (1988) Assessment of the pathogenicity of bacterial species isolated from acute dental alveolar abscesses. *Journal of the Medicine Microbiology*, 27, 109-116.
- LEWIS M.A.O., MACFARLANE T.W., MCGOWAN D.A. (1990) A microbiological and clinical review of the acute dental alveolar abscess. *British Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 28, 359-366.

- MATUSOW R.J. (1981) Acute-alveolar cellulitis syndrome. Part II. Clinical assesment of antibiotic effectiveness against microbes isolated from intact teeth. *Oral Surgery* 52, 187-196.
- MILLER W.D. (1894) An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dental Cosmos*, 36, 505-528.
- MÖLLÉR A . J. R. (1966) Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies. *Odontology Tidskr.*, 74, 1-380.
- MÖLLER A.J.R., FABRICIUS J.R., DAHLÉN G., ÖHMAN A.E., HEYDEN G. (1981) Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal Dental Research*, 890, 475-484.
- MORSE D.R. (1970) The endodontic culture technique: A critical evaluation. *Oral Surgery*, 30, 540-544.
- MORSE D.R. (1971) The endodontic culture techniqne: An impractical and unnecessary procedure. *Dental Clinical of the North American*, 14, 793-806.
- MORSE D.R. (1987) In: COHEN S. & BURNS R.C. *Patways of the pulp*. 4^a ed. St. Louis, Mosby Co.

NACHNANI S., SCUTERI A., NEWMAN M.G., AVANESSIAN A.B., LOMELI S.L.

(1992) *E-test* : A new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *Journal of Periodontology*, 63, 576-583.

NAIR P.N.R. (1987) Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 13, 29-39.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (1997)

Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standard. 3th ed. NCCLS document M100-S8 M11-A4, tabela 1, 17. Villanova. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards.

NGUI-YEN J.H., BRYCE E.A., PORTER C., SMITH J.A. (1992) Evaluation of the *E-test* by using selected Gram-positive bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, 30, 2150-2152.

OGUNTEBI B., SLEE A.M., TANZER J.M., LANGELAND K. (1982) Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. *Journal of Clinical Microbiology*, 15, 964-966.

OLSSON-LIJEQUEST B. (1992) *E-test* as a routine MIC tool for reference work. *Diagnostic and Microbiology Infectious Disease*, 15, 479-482.

- ONDERDONK T.W. (1901) Treatment of unfilled root canals. *International Dental Journal*, 22, 20-22.
- RAMS T.E., FEIK D., LISTGARTEN M.A., SLOTS J. (1992) *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 7, 1-6.
- RASMUSSEN B. A., BUSH K., TALLY F.P. (1993) Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clinical Infectious Disease*, 16(Suppl 4), S390-400.
- ROSEMBLATT J.E. & BROOK I. (1993) Clinical relevance of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clinical Infectious Disease*, 16 (suppl4), S446-S448.
- SABISTON C.B. & GOLD W.A. (1974) Anaerobic bacteria in oral infections. *Oral Surgery*, 38, 187-192.
- SABISTON C.B., GRIGSBY W.R., SEGERSTROM N. (1976) Bacterial study of pyogenic infections of dental origin. *Oral Surgery*, 41, 430-435.
- SATO T., HOSHINO E., UEMATSU H., NODA T. (1983) Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human intact teeth. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 6, 269-275.

- SIQUEIRA J.F.Jr., MAGALHÃES F.A.C., LIMA K.C., UZEDA M. (1998)
Pathogenicity of facultative and obligate anaerobe bacteria in monoculture and combined with either *Prevotella intermedia* or *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiology and Immunology*, 13, 368-372.
- SUNDQVIST G. (1976) Bacteriologic studies of necrotic dental pulps.
Odontological Dissertation n° 7, University of Umea, Sweden.
- SUNDQVIST G., ECKERBOM M.I., LARSSON A.P., SJÖGREN U.T. (1979)
Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infection and Immunity*, 25, 685-693.
- SUNDQVIST G., JOHANSSON E., SJÖGREN U. (1989) Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *J. Endod.*, 15, 13-19.
- 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, 257-262.
- SUNDQVIST G. (1994) Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 78, 522-530.

- TAKAHASHI K. (1998) Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal*, 31, 311-325.
- THILO B.E., BAEHNI P., HOLZ J. (1986) Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. *Journal of Endodontics*, 12, 202-205.
- TOMASZ A. (1994) Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. *The New England Journal of Medicine*, 28, 1247-1251.
- TORABINEJAD M. & KIGER R.D. (1985) A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 59, 198-200.
- TRONSTAD L., BARNETT F., RISO K., SLOTS J. (1987) Extraradicular endodontic infections. *Endodontic and Dental Traumatology*, 3, 86-90.
- TROPE M., TRONSTAD L., ROSENBERG E.S., LISTGARTEN M. (1988) Dark-field microscopy as a diagnostic aid in differentiating exudates from endodontic and periodontal abscesses., *Journal of Endodontics*, 14, 35-38.

- VAN DALEN P.J., VAN DEUTEKOM-MULDER E.C., GRAAFF J., VAN STEENBERGEN J.M. (1998) Pathogenicity of *Peptostreptococcus micros* morphotypes and *Prevotella* species in pure and mixed culture. *Journal of the Medicine Microbiology*, 47, 135-140.
- VAN STEENBERGEN T.J.M., KASTELEIN P., TOUW J.J.A., GRAAFF J. (1982) Virulence of black-pigmented *Bacteroides* strains from periodontal pockets and other sites in experimentally induced skin lesions in mice. *Journal of Periodontal Research*, 17, 41-49.
- VAN STEENBERGEN T.J.M., VAN WINKELHOFF A.J., GRAAFF J., DUERDEN B.I. (1993) Antibiotic susceptibility of black pigmented Gram-negative anaerobes. *Immunology and Medicine Microbiology*, 6, 229-234.
- VAN WINKELHOFF A.J., CARLEE A.W., DE GRAAFF J. (1985) *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infection and Immunity*, 49, 494-497.
- VAN WINKELHOFF A.J., CLEMENT M., DE GRAAFF J. (1988) RapID characterization of oral and nonoral pigmented *Bacteroides* species with the ATB Anaerobes ID system. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 1063-1065.

VIGIL G.V., WAYMAN B.E., DAZEY S.E., FOWLER C.B., BRADLEY D.V. (1997)

Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 23, 110-114.

WALKER C. (1992) Antimicrobial agents and chemotherapy. In: Slots J., Taubman

M.A. eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, St. Louis, MO, USA: Mosby Year Book, 242-264.

WASFY M.O., MCMAHON K.T., MINAH G.E., FALKLER W.A. (1992)

Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiology and Immunology*, 7, 100-105.

WEINE F.S. (1989) *Endodontic Therapy*. 4th edn. St. Louis, Mosby, USA: The C.V. Mosby Co.

WEXLER H.M. (1993) Susceptibility testing of anaerobic bacteria – the state of the art. *Clinical Infectious Disease*, 16 (suppl 4), S328-S333.

WHITE E. (1976) Microbiologic considerations in endodontics. In: INGLE J.I., ed. *Endodontics*. 2nd edn. Philadelphia, P.A., USA: Lea & Febiger.

WILLIAMS B.L., MCCANN G.F., SCHENKNECHT F.D. (1983) Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 18, 770-774.

- 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, 112-116.
- YOSHIDA M., FUKUSHIMA H., YAMAMOTO K., OGAWA K., TODA T., SAGAWA H. (1987) Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals with periapical pathosis. *Journal of Endodontics*, 13, 24-28.
- ZAVISTOSKI J., DZINK J., ONDERDONK A., BARTLETT J. (1980) Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 49, 171-174.
- ZELDOW B.J. & INGLE J.I. (1962) Management of periapical infection: antibiotic sensitivity of bacteria isolated from root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 15, 721-726.

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO ESPECÍFICO PARA A PESQUISA

TÍTULO: “ESTUDO BACTERIOLÓGICO DE CANAIS RADICULARES ASSOCIADOS A ABSCESSOS PERIAPICAIS”

Esta pesquisa visa a identificação de bactérias encontradas nos canais radiculares de dentes que precisam de tratamento de canal e apresentam abscesso periapical.

Neste estudo iremos:

- a) investigar os tipos de bactérias encontrados nos canais radiculares de pacientes que apresentam abscessos periapicais;

* Abscessos periapicais são caracterizados por acúmulo de pus nos tecidos ao redor da raiz dental, em geral, devido à presença de bactérias no interior do canal radicular.
- b) determinar se há relação destas bactérias com a localização dos abscessos;
- c) analisar a sensibilidade das bactérias isoladas de canais radiculares com abscessos periapicais, à diversos tipos de antibióticos.

Para que servirá a sua participação:

Os resultados obtidos irão auxiliar no entendimento de sinais (inchaço) e sintomas (dor) de pacientes com abscessos. A identificação das bactérias no canal radicular, possibilitará a realização de um antibiograma (estudo da sensibilidade dessas bactérias a antibióticos existentes no mercado farmacêutico) que nos orientará a escolha de antibióticos, que quando necessário, complementar o tratamento de emergência, ajudando o organismo a combater a infecção.

Como será feito?

A coleta de amostra de bactéria é simples e faz parte do tratamento de canal que já é realizado nesta Faculdade, não existindo outro método alternativo para tal. Ela consiste em colocar uma ponta de papel absorvente estéril dentro do canal radicular, sendo que esta ponta absorvente já é utilizada rotineiramente no tratamento endodôntico, para secar o canal.

Os procedimentos a serem realizados serão: assepsia durante toda a tratamento de canal e durante coleta de bactérias; colocação do isolamento absoluto no paciente com a utilização do lençol de borracha; descontaminação do campo operatório; confecção da abertura coronária do dente e, em seguida, a coleta das bactérias com auxílio de gás nitrogênio, para manter as bactérias anaeróbias (bactérias que não vivem na presença de oxigênio do ar) vivas. Esse procedimento será realizado com o uso de um cilindro de gás nitrogênio, ao qual

se encontra acoplado uma válvula de segurança, uma mangueira e uma cânula sugadora, formando um dispositivo que direciona o gás somente para a região do dente no qual será realizada a coleta.

Nesta pesquisa, depois de secar o canal, a ponta de papel absorvente será colocada num meio de cultura líquido (“meio” utilizado para manter as bactérias coletadas vivas), que será posteriormente analisado para verificação do crescimento desses microrganismos.

O procedimento é indolor. Se caso venha sentir dor, esta dor não será por causa da coleta de bactéria e sim, devido à persistência dessa infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais (tecido que está ao redor do dente). Se a dor ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, você poderá ser atendido no Plantão de Urgência 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, sendo que o atendimento realizado será o mesmo de rotina do Plantão, que é tirar a dor. Quanto ao tratamento do dente e a outro tipo de tratamento, você será orientado pelos profissionais do Plantão a procurar a Triagem da Faculdade ou outro tipo de Atendimento Odontológico, como já é feito com todos os pacientes que passam pelo Atendimento do Plantão (somente o alívio da dor e orientação para outro tipo de atendimento).

Pode ocorrer algum risco?

Não terá nenhum risco de vida ou mudança no seu atendimento convencional, já realizado diariamente nesta Faculdade.

O uso da ponta de papel absorvente para secar os canais radiculares faz parte do tratamento de canal de rotina e não traz nenhum risco de vida.

Como já mencionado o procedimento é indolor.

Durante todo o tratamento de canal e coleta de bactéria serão utilizados, luvas e óculos de segurança para proteção do operador e do paciente.

Quais são os benefícios?

Os benefícios prestados estão diretamente relacionados com o desenvolvimento de um tratamento de canal mais eficaz, baseado nos resultados da pesquisa clínica. Por exemplo, se for constatado qual o antibiótico tem maior efeito sobre as bactérias coletadas do próprio paciente, este sairá ganhando, pois conseguiremos com a administração de antibióticos adequados, auxiliar o organismo a combater a infecção e se recuperar.

Esclarecimentos sobre a pesquisa:

Se participar desta pesquisa, terá toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia (como é feito o trabalho) antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente, com alívio da dor no Plantão de Urgência e orientação para a continuação do tratamento.

Se recusar a participar ou retirar o seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, você não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos (estudo do tipo de bactéria encontrada no canal) serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a sua privacidade quanto aos dados confidenciais que possam a ser envolvidos nesta pesquisa.

Se participar desta pesquisa não terá nenhum gasto financeiro. Se por acaso, houver necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento de canal convencional, os gastos com este deslocamento serão ressarcidos.

Qualquer dúvida com relação a pesquisa, poderá nos encontrar através do telefone 4305215 - Departamento de Endodontia, procurar por Prof. Dr. Caio ou Ezilmara, Av. Limeira, 901 – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-UNICAMP.

TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Declaro para os devidos fins que eu, -----
-----, me disponho a participar da pesquisa intitulada **“ESTUDO BACTERIOLÓGICO DOS ABSCESSOS PERIPAPICAIS”** 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 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:

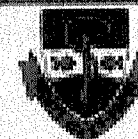
Local e data:



UNICAMP

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba
CEP-FOP-UNICAMP



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Estudo bacteriológico dos abscessos periapicais", sob o protocolo nº 78/99, do Pesquisador(a) **EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA**, sob a responsabilidade do Prof(a). Dr(a). Luiz Malagrida, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - FOP.

Piracicaba, 01 de dezembro de 1999

We certify that the research project with title "bacteriologic study of periapical abscesses", protocol nº 78/99, by Researcher **EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA**, responsibility by Prof. Dr. Luiz Malagrida, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, 01 december 1999


Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen
Secretário - CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Antonio Bento Alves de Moraes
Coordenador - CEP/FOP/UNICAMP

MEIOS DE CULTURA

Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – Agar para anaeróbios exigentes – (LAB-M, Bury-Inglaterra)

1. Descrição

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

As peptonas são incorporadas para máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato de sódio atuam como agentes desintoxicantes, enquanto que a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” de pigmento preto. Agentes específicos de estimulação de crescimento são os seguintes: cisteína para *Fusobacterium necrophorum*, *Propionibacterium acnes* e *Bacteroides fragilis*; arginina para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*. Piruvato contribui para 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 de álcoois que poderiam inibir o crescimento microbiano.

2. Método para reconstituição

Dispensar 23,0 g do pó em 500mL de água deonizada. 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.

Este meio pode ser seletivo para várias espécies de anaeróbios através da adição de antibióticos seletivos, exemplo:

1. Anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos e *Actinomyces*: ácido nalidíxico (Lab X091).
2. *Clostridium* spp. (anaeróbios esporulados) e outros anaeróbios: neomicina (Lab X015).
3. Anaeróbios Gram-negativos: ácido nalidíxico + vancomicina (Lab X090).

3. Aparência

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

4. Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4° C no escuro.

5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

6. Incubação

À 37° C anaerobicamente em atmosfera de 80% H₂, 10% N₂, 10% CO₂, por períodos entre 48 horas e 7 dias.

7. Fórmula

Fórmula..... g/L

Mistura de peptona 23,0

Cloreto de sódio..... 5,0

Amido solúvel..... 1,0

Ágar nº 2..... 12,0

Glicose..... 0,4

Piruvato de sódio.....	1,0
Monoidrato HCL cisteína	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	



FIGURA 13- Frasco contendo ágar para anaeróbios exigentes FAA – Fastidious Anaerobe Agar (meio sólido)

MEIOS SELETIVOS

Fastidious Anaerobe Agar (FAA)

a) FAA + NAL (ácido nalidíxico-X 091) – LAB-M, Bury-Inglaterra

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

Preparo:

Para 500mL de água deonizada + FAA (g) + 5% de sangue de carneiro, utiliza-se um vidro de ácido nalidíxico (X091) que é diluído em 5 mL de água destilada previamente, e em seguida a mistura é adicionada assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final:

- Ácido nalidíxico = 0,01mg/mL.

b) FAA + NAL + VAN (Vancomicina-X090) – LAB-M, Bury-Inglaterra

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

Preparo:

Para 500mL de água deonizada + FAA (g) + 5% de sangue de carneiro, utiliza-se um vidro de ácido nalidíxico (X091) e um vidro de vancomicina (X090) que são diluídos em 5 mL de água destilada previamente, e em seguida a mistura é adicionada assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final:

- Ácido nalidíxico = 0,01mg/mL
- Vancomicina = 0,0025mg/mL

c) FAA + NEO (neomicina-X015) – LAB-M, Bury-Inglaterra

Este meio é seletivo para clostrídios e outros anaeróbios, como *Bacteroides fragilis* e alguns cocos anaeróbios.

Preparo:

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue de carneiro, utiliza-se um vidro de neomicina que é diluído em 5 mL de água destilada previamente, e em seguida a mistura é adicionada assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final:

- neomicina = 0,075mg/mL

d) FAA + VAN (X090) +KAN (Kanamicina-X018) – LAB-M, Bury-Inglaterra

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-negativos, particularmente bactérias pigmentadas em preto.

Preparo:

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue de carneiro, utiliza-se um vidro de vancomicina (X090) e um vidro de Kanamicina (X018) que são diluídos em 5 mL de água destilada previamente, e em seguida a mistura é

adicionada assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final:

- Vancomicina = 0,0025mg/mL
- Kanamicina = 0,075mg/mL

SUPLEMENTO ANAERÓBICO G-N

Anaerobe Selective Supplement G-N (OXOID, Hamshire-Inglaterra)

Suplemento seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

1.Composição

Cada vidro é suficiente para suplementar 500 mL de meio.

Hemina.....	2,50 mg
Menadiona	0,25 mg
Succinato sódico.....	1,25 mg
Ácido nalidíxico	5,0 mg
Vancomicina.....	1,25 mg

2.Instruções para o uso

Agregar ao vidro, 10 mL de água destilada e misturar suavemente até dissolver completamente. Após, agregar o conteúdo do vidro à 500 mL de meio de cultura + 5% de sangue de carneiro desfibrinado que deve estar a 47°C. Misturar bem e distribuir em placas estéreis.

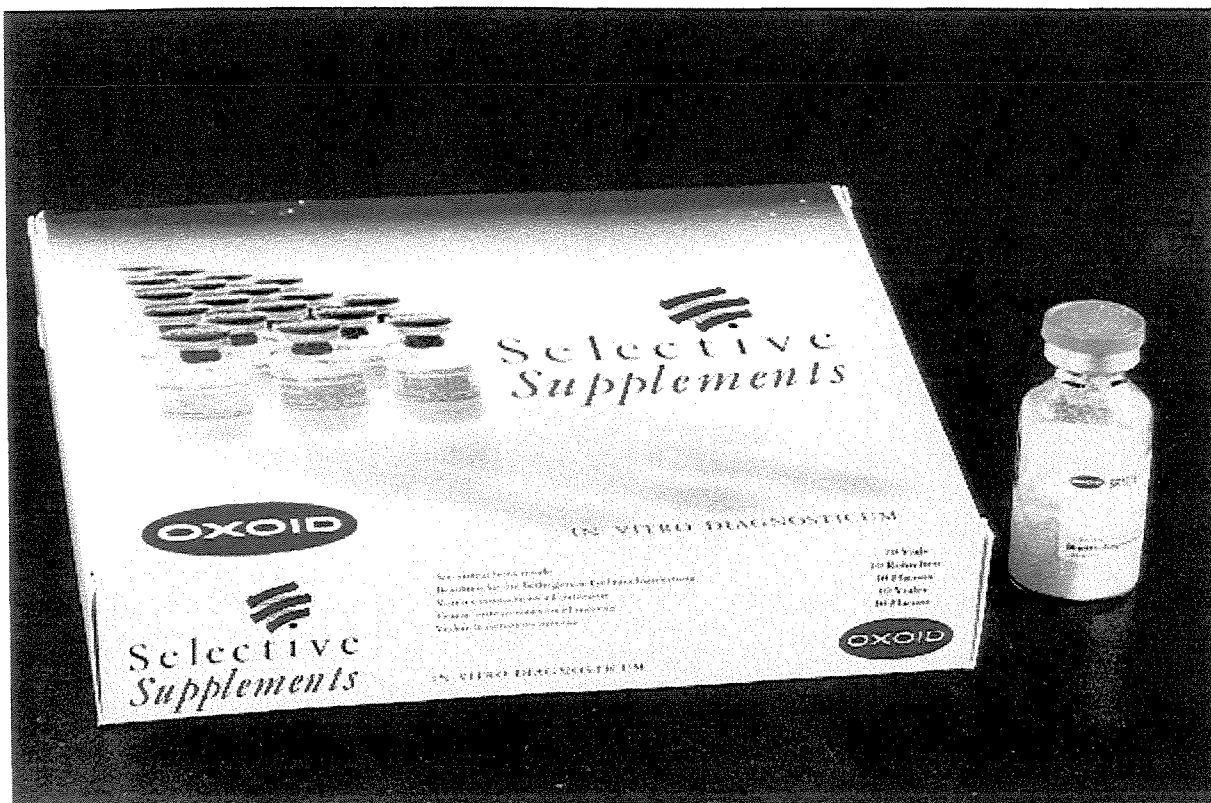


FIGURA 14 – Embalagem do suplemento seletivo para bactérias Gram-negativas

Fastidious Anaerobe Broth (FAB) – Agar para anaeróbios exigentes – (LAB-M, Bury-Inglaterra)

1. Descrição

Desenvolvido pela LAB-M em conjunto com o laboratório de microbiologia do Hospital HOPE, Salford-Inglaterra.

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

As peptonas são incorporadas para máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína junto com tioglicolato de sódio reduz o Eh (redox) do meio e o ágar inibe a absorção do oxigênio e corrente de propagação.

2. Método para reconstituição

Dispensar 14,85g de pó é adicionado a 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min., depois agitada para misturar e fervida para dissolver o ágar. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min.. Os tubos são fechados após a autoclavagem.

3. Aparência

Amarelo, claro, viscoso. Pode alterar a cor ao ter contato com a ação do

oxigênio. Se o meio tornar-se avermelhado indica que o oxigênio está sendo absorvido, e o meio deve ser reaquescido para desoxigenar. Não pode reaquescer mais de uma vez.

4. Armazenagem do meio preparado

Em tubos, no máximo por três meses de 15-20°C no escuro.

5. Inoculação

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

6. Incubação

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

7. Fórmula

Fórmulag/L

Mistura de peptona.....15,0

Extrato de Levedura.....1,0

Tioglicolato de sódio.....12,0

Cloreto de sódio2,5

Ágar nº 10,75

L-cisteíne HCL.....	0,5
Resazurin.....	0,001
Bicarbonato de sódio.....	0,4
Hemina.....	0,005
Vitamina K.....	0,005

PH: 7,2 ± 0,2



FIGURA 15 – Frasco contendo ágar para anaeróbios exigentes FAB – Fastidious Anaerobe Broth (meio em caldo)

Brucella Medium Base (OXOID, Hampshire-Inglaterra)

1. Descrição

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

2. Método para reconstituição

Dispensar 22,5,0 g do pó em 500mL 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, 500µL de Hemina[#] e menadiona^{##} preparados previamente, misturar bem e distribuir em placas de petri estéreis.

[#] A hemina favorece a produção de pigmento nos "*Bacteroides*" de pigmento preto.

^{##} Vitamina K fornece fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios.

3. Aparência

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

4. Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4° C no escuro.

5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

6. Incubação

À 37° C anaerobicamente em atmosfera de 80% H₂, 10% N₂, 10% CO₂, por períodos entre 48 horas e 7 dias.

7. Fórmula

Fórmulag/L

Peptona10,0

Extrato de carne.....	5,0
Glicose.....	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar.....	15,0

PH: 7,5 ± 0,2

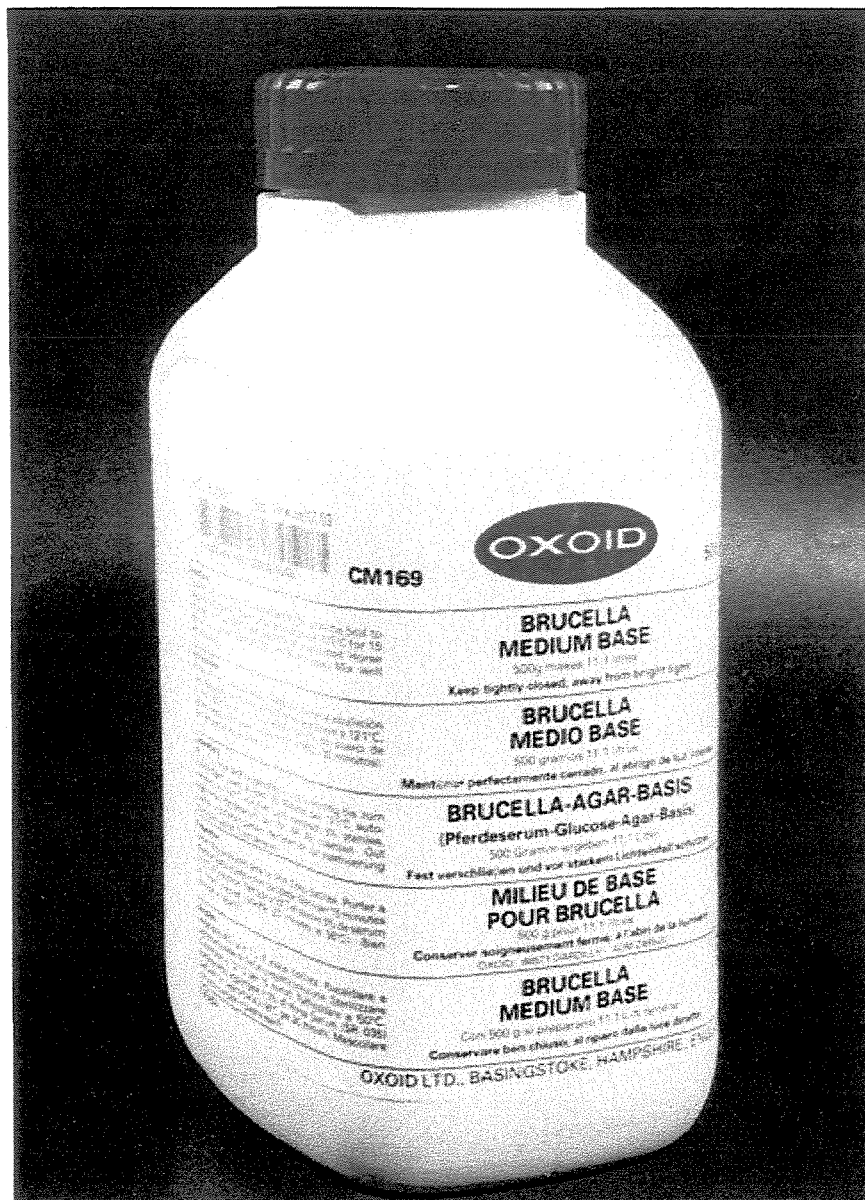


FIGURA 16 – Frasco contendo meio de cultura ágar Brucella (utilizado no teste de suscetibilidade – *E-test*)

MEIO DE TRANSPORTE

VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar

1. Propriedades

Consistência – semi-sólido em temperatura ambiente, semi-fluido acima de 30°C
(0,2% ágar – 5% gelatina)

Substância neutralizante – carvão no veículo de amostragem

Solução protetora (colóide)– Produção de peptona 0,1%, gelatina 5%

Indicador de oxi-redução – azul de metileno

Comentários – Este meio deve ser colocado em um recipiente bem fechado. Pode ser armazenado por um longo tempo sem ter contato com oxigênio.

Aplicação – para amostragens pequenas como por exemplo com ponta de papel absorvente.

2. Componentes

Componentes.....quantidade

1. Gelatina ¹10,0g

2. Triptose ²5,0g

3. Thiotone ³5,0g

4.Cisteína HCL ⁴	0,5g
5.Ácido de tioglicolato (99%) ⁵	0,5mL
6.Água destilada	900mL
7.Solução de sal estoque @	100mL

Os ingredientes de 1 a 6 são dissolvidos na água destilada e misturados com a solução de sal (7). O pH é ajustado a 7,4 com solução de hidróxido de Sódio (Na OH=1M). O meio é dispensado em tubos (3-50mL) ou em eppendorfs e autoclavados a 121°C por 20 min.. Estocados a temperatura ambiente.

@ Solução de sal estoque

Ca Cl ₂ . 6H ₂ O pro anal.....	2,4g
KCL pro anal.....	4,2g
NaCL.....	10,0g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.....	1,0g
Glicerofosfato de sódio.....	100g
Água destilada	1000mL

Os sais são dissolvidos em 800 mL de água destilada. O volume é completado com água destilada. Estocado a + 5°C.

Fabricantes:

1. Gelatina – Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA, # 0143
2. Triptose - Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA, # 0124

3. Thiotone – BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, EUA, # 02-108
4. Solução de cisteína (Cisteína-Hipoclorito) – Merck # 2839
5. Ácido tioglicolato - Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA, # 0250

“KITS” DE IDENTIFICAÇÃO

RapID ID 32A

1. Descrição

O sistema RAPID ID 32A (#3 230 0) é um sistema de identificação para anaeróbios usando testes enzimáticos miniaturizados e padronizados.

Cada “kit” consiste de 25 fitas, caixa de plástico para incubação fechada, bloco de anotações para os resultados e o manual de instruções. Cada fita possui 32 cúpulas, sendo que 29 contém substâncias desidratadas e são usadas para os testes. Após a incubação durante 4 horas, as reações são lidas usando “ATB instruments” ou pelo método visual. A identificação é obtida usando o Analytical Profile Index (para leitura visual) usando o “ATB PLUS” ou através de um programa de computador chamado “APILAB ID 32” (para leitura automatizada).

O “kit” RapID ID 32 *Strep* deve ser estocado a 2-8°C.

2. Materiais

a) Meio para suspensão (#7 060 0) ou 2 mL de água destilada

b) Reagente JAMES (#7 054 0)

Componente J 2183.....0,5g

HCL N qsp.....100mL

d) Reagente para redução de Nitrato

NIT 1 (#7 044 0)

Ácido Sulfanílico.....0,8g

Ácido acético 5 N.....100mL

NIT 2 (#7 045 0)

N-N-Dimetil-1-naftilamine.....7,00g

Ácido acético 5 N.....100mL

e) Reagente FB (#7 056 0)

Fast Blue.....0,35g

Solvente orgânico qsp.....100mL

f) Óleo mineral (#7 010 0)

g) "Swabs" estéreis

h) Padrão McFarland: 4 (#7 090 0)

- i) Pipeta Plástica
- j) Placas contendo meio de cultura (ágar + Sangue)
- k) Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglaterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglaterra) ou Câmara de anaerobiose

3. Procedimentos para a identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro por 24-48 horas a 37°C, sob condições anaeróbias, de acordo com a necessidade do microrganismo, obtendo-se assim, melhores condições de crescimento. A cultura deve estar pura, observado a morfologia da colônia, Coloração pelo método de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Estes procedimentos permitem a identificação primária das espécies em Cocos Gram-positivos, catalase-negativa e anaerobiose facultativa.

Um “Swab” estéril é usado para a inoculação no meio em suspensão ou na água estéril sem aditivos. O inóculo em suspensão homogênea é ajustado a turbidez do Padrão McFarland 4.

Uma pipeta estéril é introduzida no inóculo, e cada cúpula da fita é

inoculada com 2 gotas da suspensão bacteriana. Após, duas gotas de óleo mineral é adicionado na cúpula URE (1.0).

A fita é colocada na caixa de plástico e levada para incubação, sob condições aeróbias a 37°C por 4 horas.

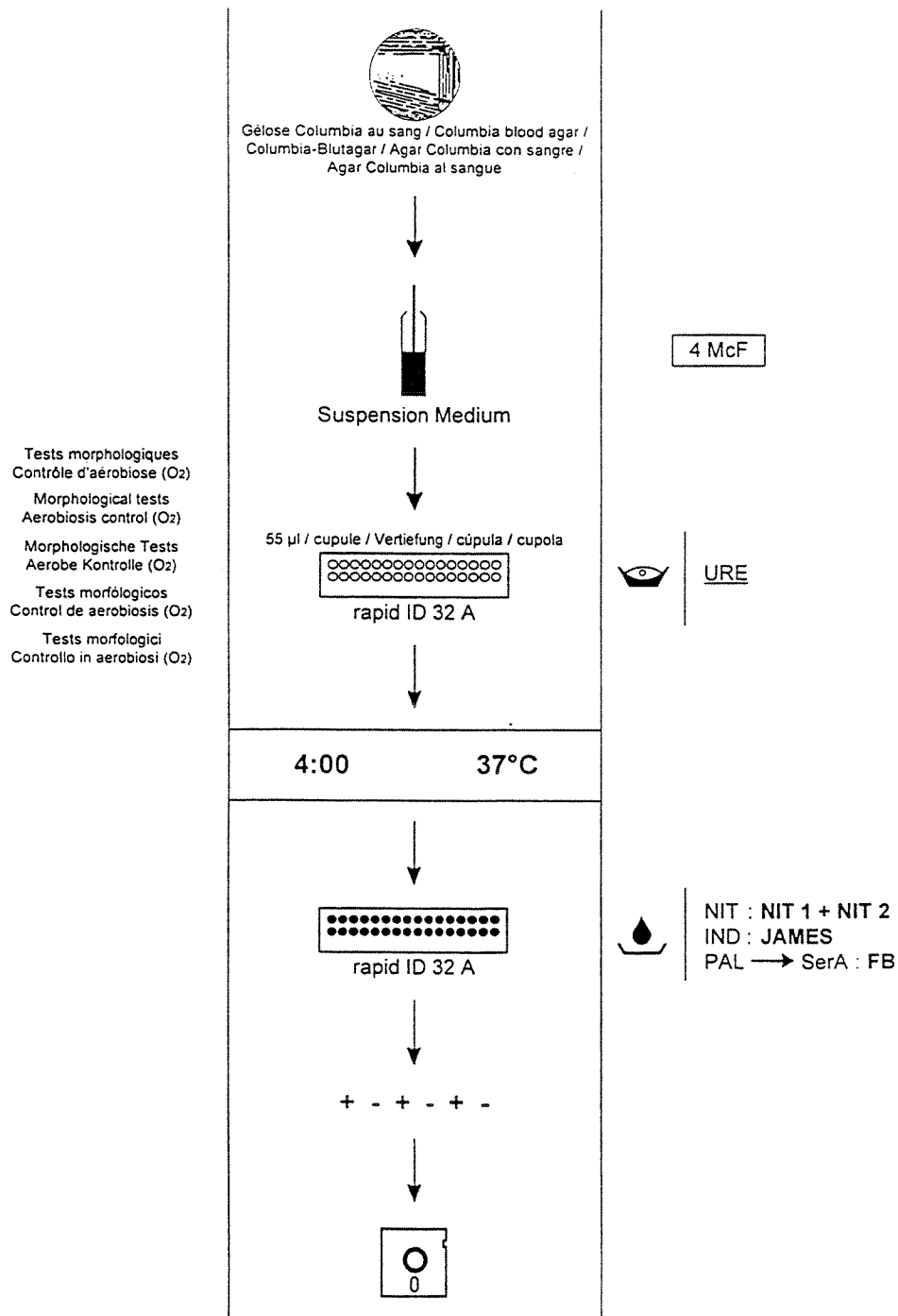


FIGURA 17– Ilustração representativa dos procedimentos para identificação do “kit” de identificação Rapid ID 32A

CUPULE	TEST	REACTION	RESULT	
			NEGATIVE	POSITIVE
1.0	URE	UREase	yellow	red
1.1	ADH	Arginine DiHydrolase		
1.2	αGAL	alpha GALactosidase	colorless	yellow
1.3	βGAL	beta GALactosidase		
1.4	βGP	beta Galactosidase 6 Phosphate		
1.5	αGLU	alpha GLUcosidase		
1.6	βGLU	beta GLUcosidase		
1.7	αARA	alpha ARAbinosidase		
1.8	βGUR	beta GlucURonidase		
1.9	βNAG	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	αFUC	alpha FUCosidase	colorless	yellow
1.E		Empty cupules		
1.F				
0.0	NIT	Reduction of NITrates	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5 min - < 10 min</u>	
			colorless	red
0.1	IND	INDole Production	<u>JAMES / 5 min - < 10 min</u>	
			colorless	pink
0.2	PAL	Phosphatase ALcaline	<u>FB / 5 min - < 10 min</u>	
			colorless	purple
0.3	ArgA	Arginine Arylamidase	<u>FB / 5 min - < 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		

FIGURA 18– Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação Rapid ID 32A

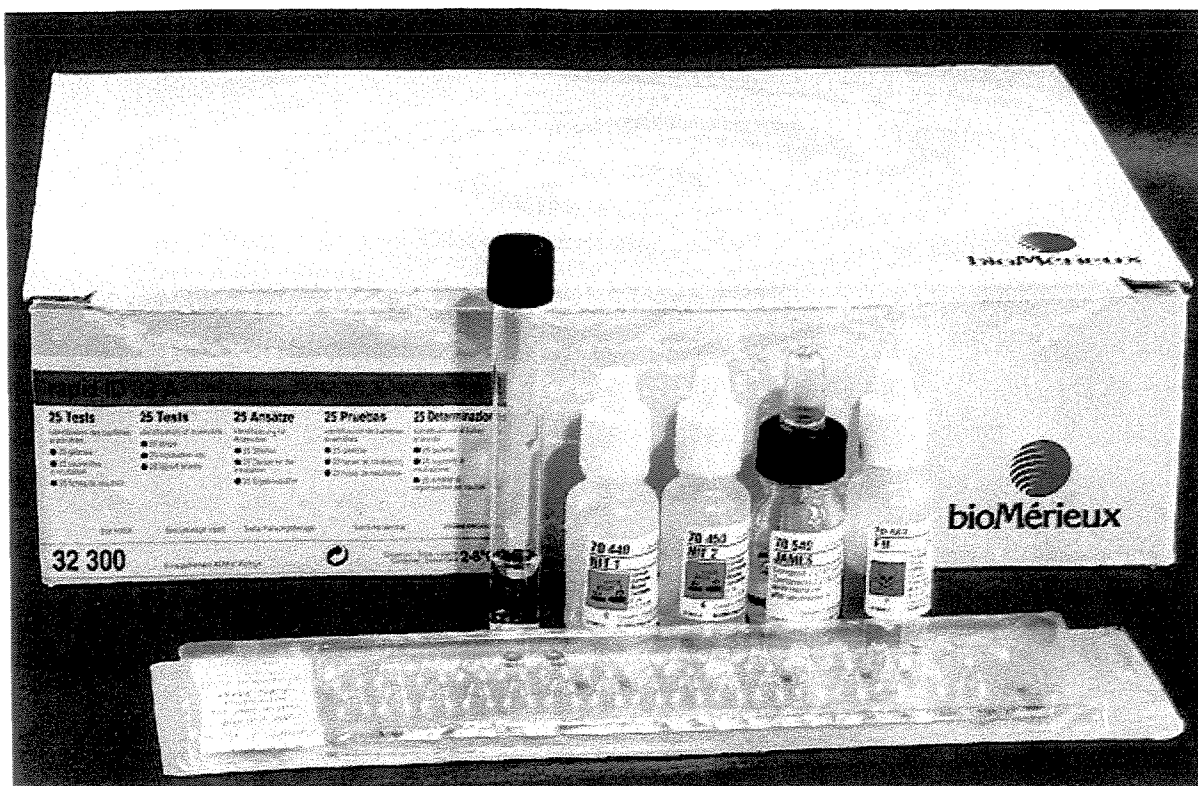


FIGURA 19 – Embalagem do “kit” de identificação Rapid ID 32A e reagentes utilizados

RapID ANA II system

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. Testes bifuncionais 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.

2. Materiais

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

KCl	7,5g
CaCl ₂	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 hidrolórico.....	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

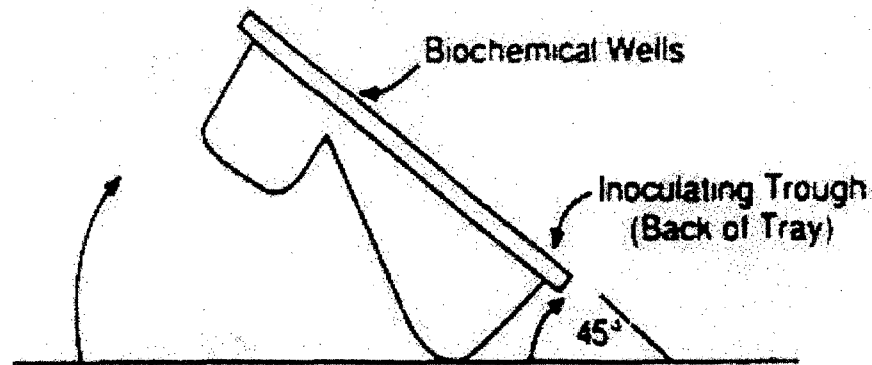
h) Jarras para anaerobiose + gerador de anaerobiose (Anaerogen-OXOID, Hampshire-Inglaterra) + indicadores de anaerobiose (OXOID, Hampshire-Inglaterra) ou Câmara de anaerobiose

3. Procedimentos para identificação

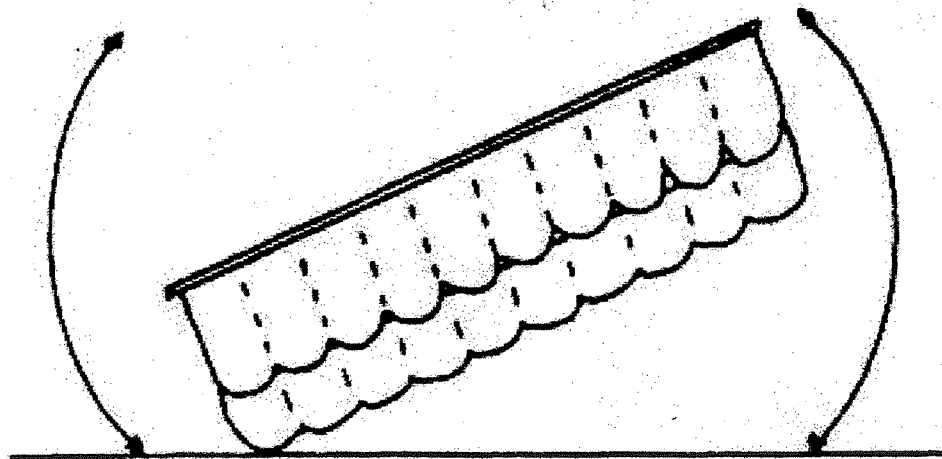
Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA+5% sangue de carneiro por 18 a 24 horas a 37°C. As culturas puras são primariamente checadas pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

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

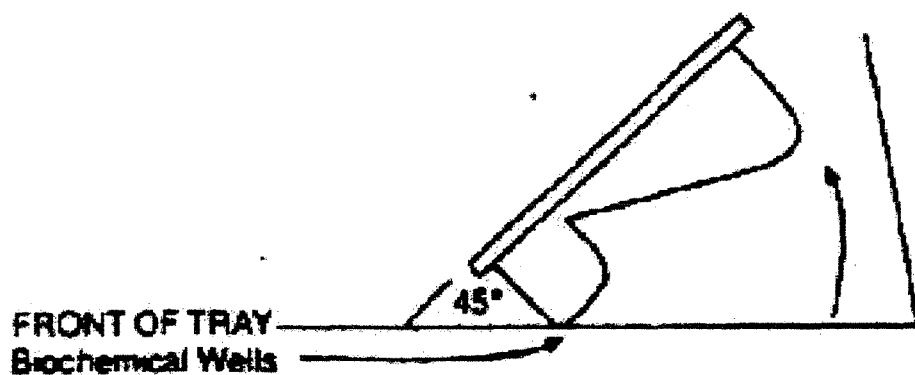
Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana, e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então, selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em superfície horizontal.



Este é gentilmente inclinado de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores.



Após, o recipiente é inclinado aproximadamente 45°, para o lado oposto fazendo com que a suspensão bacteriana escoe, para as cavidades que contêm as enzimas.

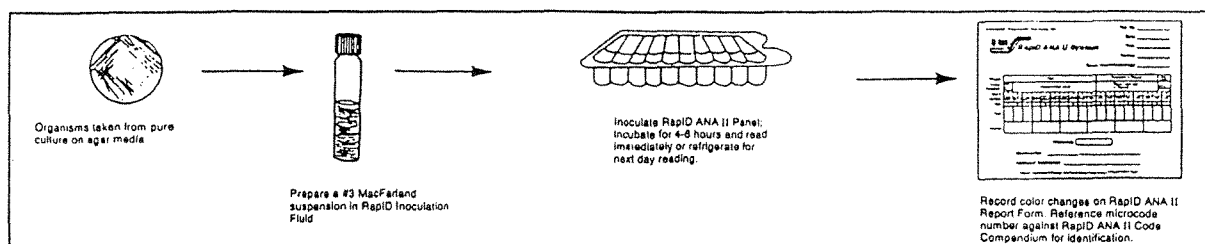


Recoloca-se o recipiente na posição horizontal e, é levemente tocado na superfície externa da cavidade para remoção de bolhas de ar. A seguir, o recipiente é incubado sob condições aeróbias a 37°C durante 4 horas.

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

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

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



INTERPRETATION OF Rapid ANA II SYSTEM TESTS

INTERPRETATION OF RAPID ANA II SYSTEM TESTS					
Cavity No.	Test Code	Reagent	Reaction		Comment
			Positive	Negative	
BEFORE REAGENT ADDITION					
1	URE	None	Red or Purple	Yellow to orange	Shades of orange or reddish-orange should be scored as negative.
2	BLTS	None	Medium or bright yellow	Clear, tan or very pale yellow	Only the development of a distinct yellow is a positive test. Pale yellow or a hint of yellow should be scored NEGATIVE .
3	aARA				
4	ONPG				
5	aGLU				
6	BGLU				
7	aGAL				
8	aFUC				
9	NAG	None	Medium or bright yellow	Clear, tan or very pale yellow	Only the development of a distinct yellow is a positive test. Pale yellow or a hint of yellow should be scored NEGATIVE .
10	PO4				
AFTER REAGENT ADDITION					
3	LGY	Rapid ANA II REAGENT	Purple, violet red or dark pink	Yellow, orange or pale pink	Allow at least 30 seconds but no more than 2 minutes for color development.
4	GLY				
5	PRO				
6	PAL				
7	ARG				
8	SER				
9	PYR	Innova Spot Indole Reagent	Blue or blue-green	Any other color	Any shade of blue or blue-green should be scored positive without regard to intensity.
10	IND				

FIGURA 20 – A- Ilustração representativa dos procedimentos para identificação do “kit” de identificação Rapid ANA II; **B-** Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação Rapid ANA II

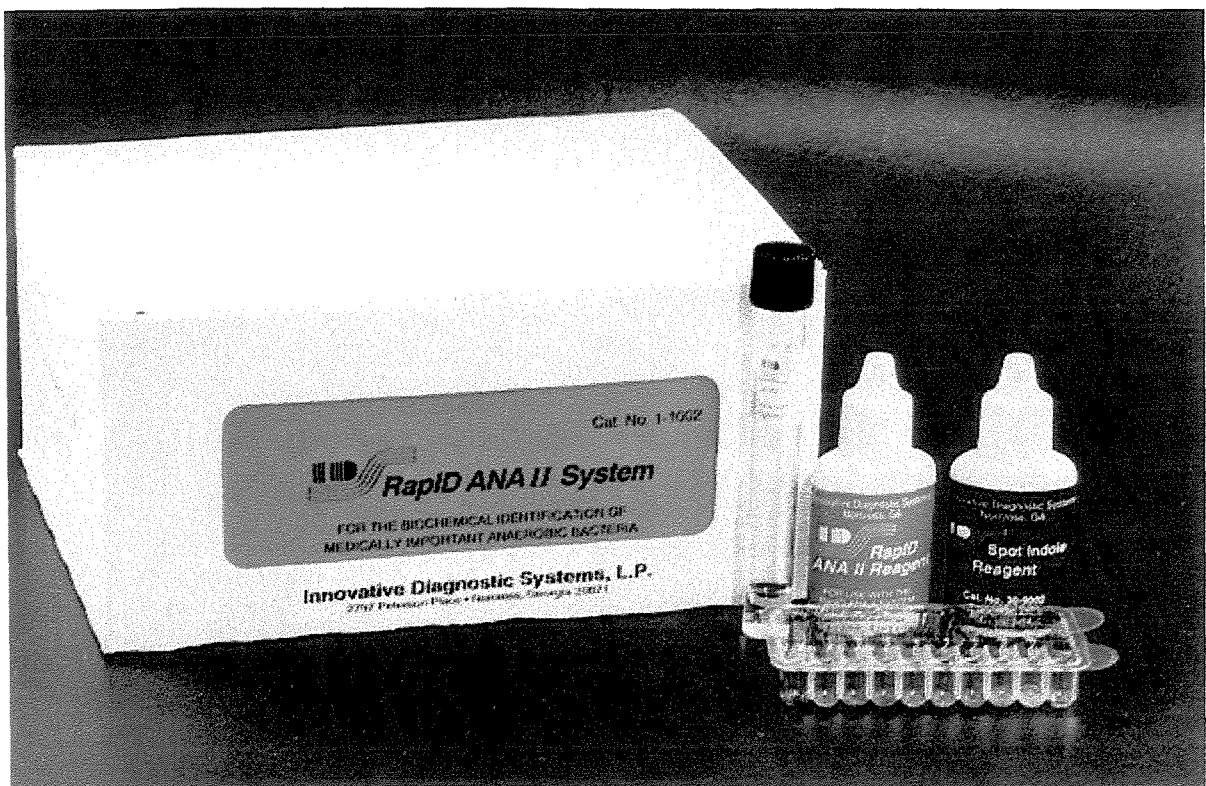


FIGURA 21 – Embalagem do “kit” de identificação Rapid ANA II e reagentes utilizados

RapID NH system

1. Descrição

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

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

O recipiente para teste de 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 (NO₂). 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 relacionados.

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 colonial 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 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.

2. Materiais

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

KCl	7,5g
CaCl ₂	0,5g
Água deionizada.....	1000 mL

pH: 7,5-9,5

- j) 1 frasco contendo 15 mL de reagente *Innova Spot Indole* (#30-9002)
- k) 1 frasco contendo 15 mL de reagente *Innova Nitrate Reagent A* (#30-9003)
- l) 1 frasco contendo 15 mL de reagente *Innova Nitrate Reagent B* (#30-9004)

m) *Swabs* estéreis

n) Padrão McFarland: 3

o) Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado

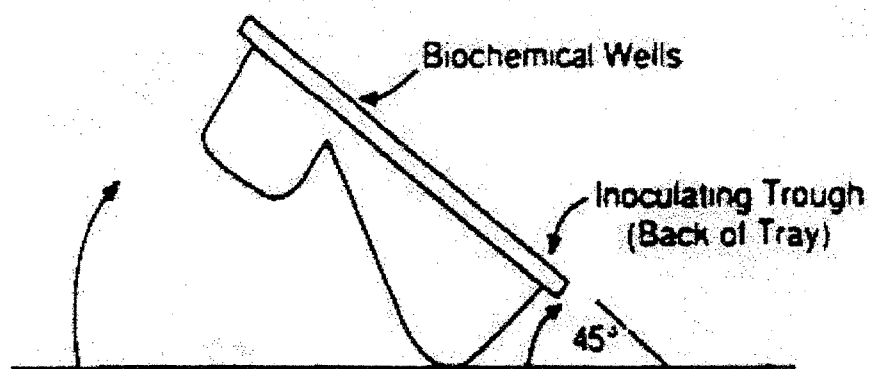
3. Procedimentos para identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA+5% 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.

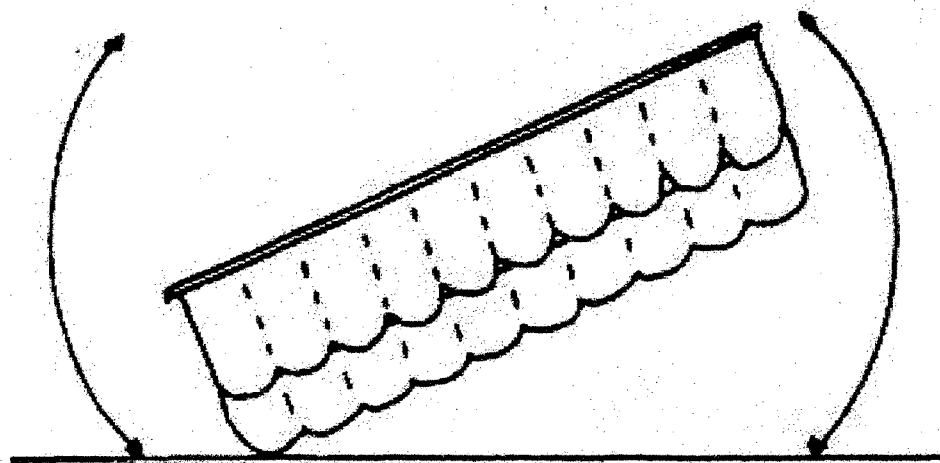
Um *swab* estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado devendo atingir no mínimo o equivalente ao padrão McFarland 3, é preparada (uma suspensão preparada com turbidez menor que padrão McFarland 3 pode comprometer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

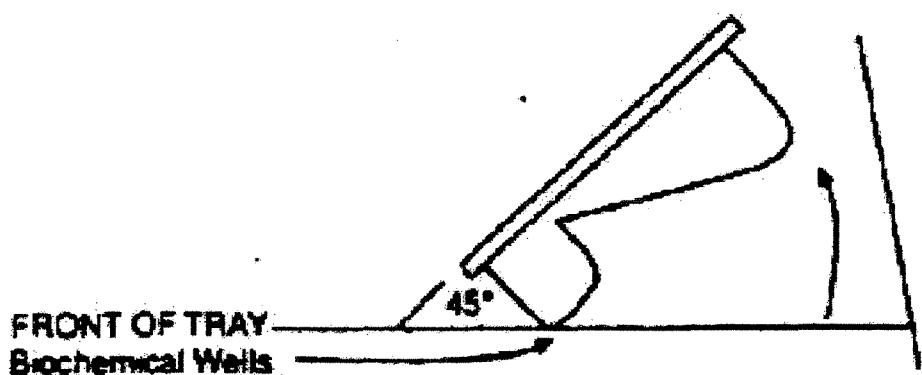
superior. O recipiente para teste é então, selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em superfície horizontal.



Este é gentilmente inclinado de forma que a suspensão seja distribuída uniformemente nas cúpulas superiores.



Após, o recipiente é inclinado aproximadamente 45°, para o lado oposto fazendo com que a suspensão bacteriana escoe, para as cavidades que contêm as enzimas.



Recoloca-se o recipiente na posição horizontal e, é levemente tocado na superfície externa da cavidade para remoção de bolhas de ar. A seguir, o recipiente é incubado sob condições aeróbias a 37°C durante 4 horas.

Após a incubação do recipiente, cada cavidade é examinada quanto a 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 da cor.

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

INTERPRETATION OF Rapid PANEL TESTS

Cavity No.	Test Code	Reagent	REACTION		Comments
			Positive	Negative	
BEFORE REAGENT ADDITION:					
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.
AFTER REAGENT ADDITION: 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 22 - Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação Rapid NH

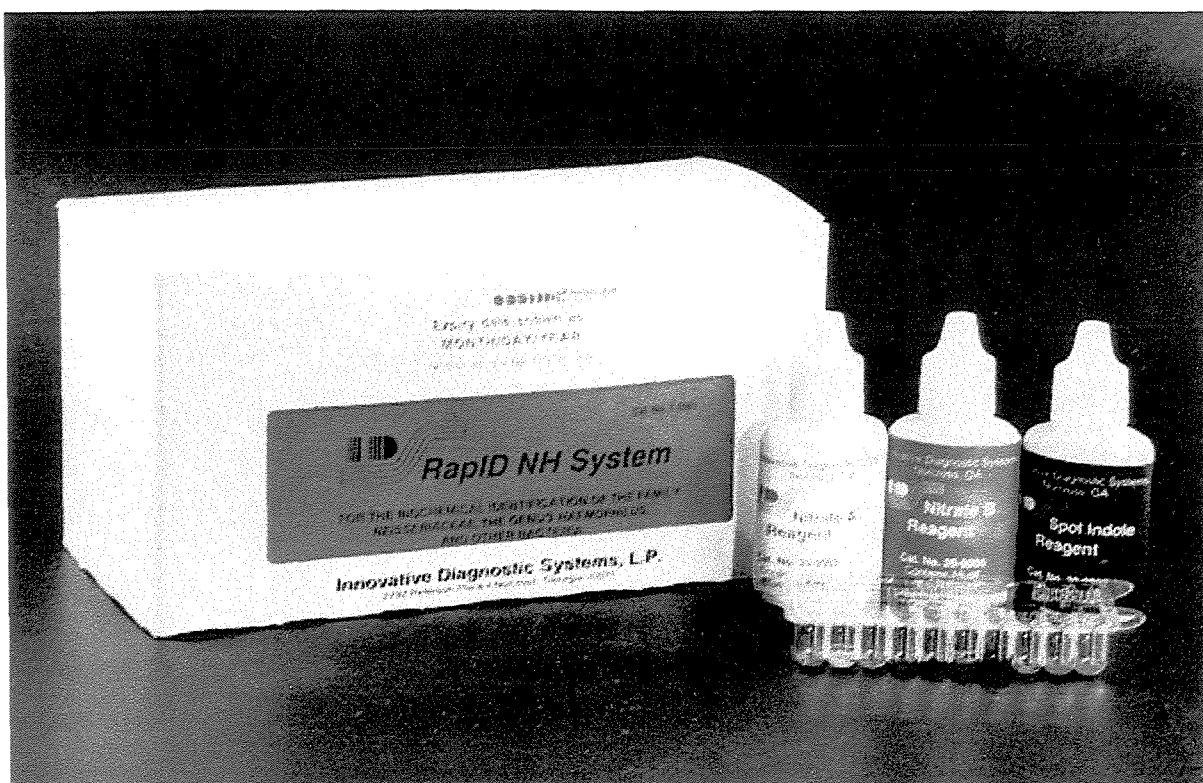


FIGURA 23- Embalagem do “kit” de identificação Rapid NH e reagentes utilizados

API 20 Strep

1. Descrição

O sistema *API 20 Strep* (#) é um teste bioquímico para identificação da maioria dos *Streptococos* encontrados na bacteriologia médica baseado em 20 testes.

Cada “kit” contém 25 tiras de testes, recipiente de incubação, ampolas de meio GP, bloco de anotações para os resultados e manual de instrução *API 20 Strep*. A identificação das cepas pode ser interpretada com “Analytical Profile Index” ou com o *software* APILAB. As tiras de testes *API 20 Strep* e as ampolas devem ser armazenadas entre 2-8°C.

2. Materiais

a) Meio de suspensão

Água destilada2mL

b) GP *medium* (meio GP) 2mL

Cisteína0,5g

Triptona20,0g

Cloreto de Sódio..... 5,0g

Sulfito de Sódio0,5g

Vermelho fenol0,17g

Água desmineralizada qsp1000 mL

pH: 7,8

c) Reagentes

NIN

Ninhidrina7,0g

2-metoxietanol..... 100 mL

VP 1 (#7 042 0)

Hidróxido de Potássio40,0g

Àgua100mL

VP2 (#7 043 0)

α -naftol..... 6g

Etanol100 mL

ZYM A (#7 047 0)

Tris-hidroximetil-aminometano25g

Ácido hidrolórico11 mL

Sulfato de lauril sódio..... 10g

Água100 mL

ZYM B (#7 048 0)

Azul rápido BB..... 0,35g

2-metoxietanol100 mL

c) Padrão de McFarland: 4 (#7 090 0)

d) Pipetas plásticas descartáveis estéreis

e) Óleo Mineral (#7 010 0)

f) *Swabs* estéreis

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

3. Procedimentos para Identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado durante 18-24 horas a 37°C. A cultura pura das colônias bacterianas deve ser primariamente determinada pela morfologia das colônias, coloração de Gram, produção de catalase e requerimentos gasosos.

Estes procedimentos permitem a identificação primária das cepas como cocos Gram-positivos, catalase negativa e anaeróbios facultativos.

Swab estéril é usado para inoculação do meio de suspensão. Utiliza-se um inóculo moderado e a suspensão microbiana homogênea é ajustada com turbidez igual ao padrão McFarland 4.

Cinco mL de água é adicionado no recipiente de incubação para se manter uma atmosfera úmida e a seguir coloca-se nele uma tira de testes *API 20 Strep*.

Uma pipeta estéril é então introduzida no meio de suspensão e somente a porção inferior das cúpulas (testes VP a ADH), é preenchida com a suspensão, evitando a formação de bolhas. Na segunda metade do teste (RIB a GLYG), abrir a ampola do meio GP e o que sobrou da suspensão transferir para esta. Misturar bem e distribuir a nova suspensão nas cúpulas restantes.

Preencher as cúpulas dos testes ADH a GLYG com duas gotas de óleo mineral.

Tampar a tira e incubar o conjunto sob condições aeróbias a 37°C durante 4 horas. Após este período, adicionar os reagentes, anotar os resultados comparando-os ao resultado padrão encontrado no manual de dados *API 20 Strep*.

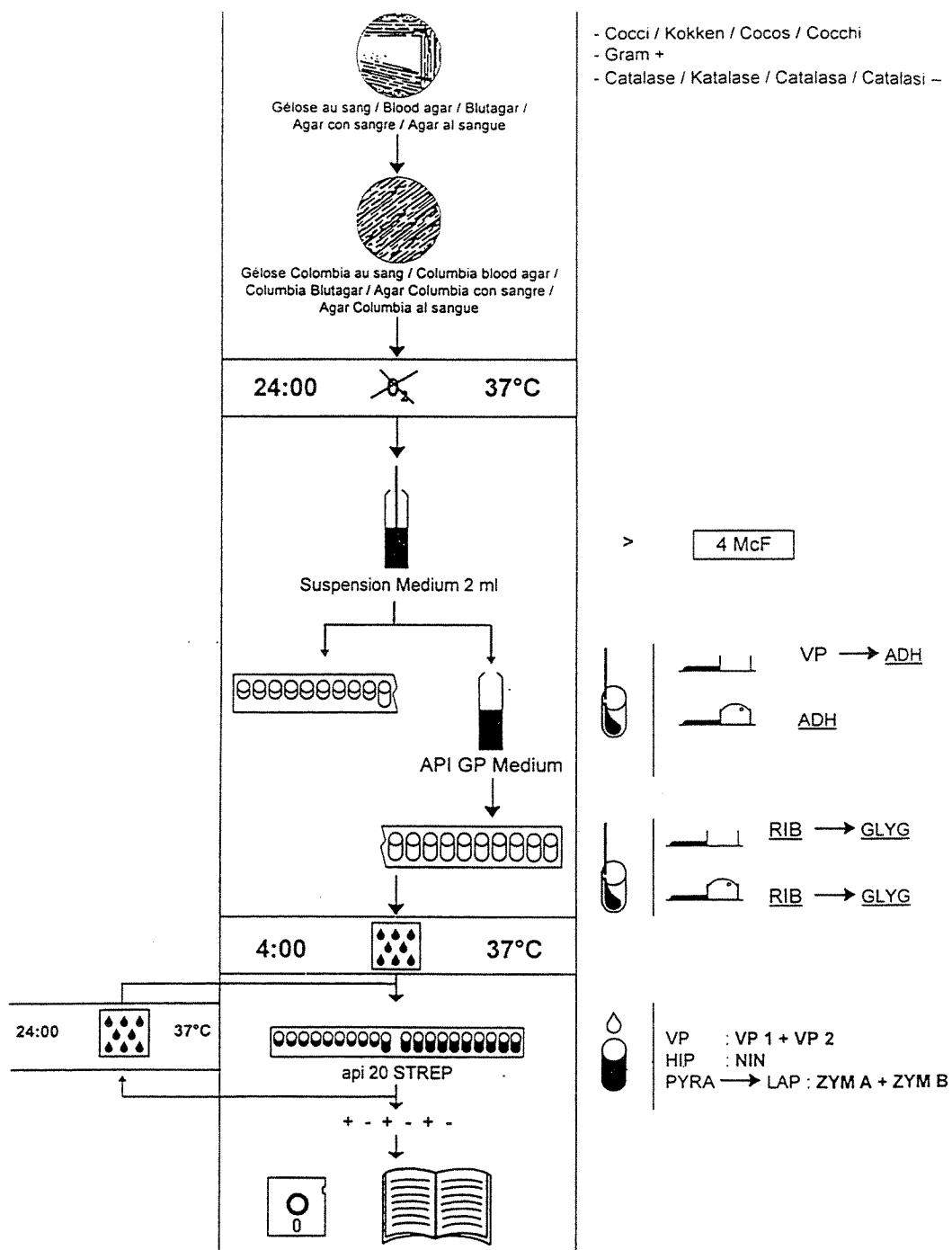


FIGURA 24 – Ilustração representativa dos procedimentos para identificação do “kit” de identificação Api 20 Strep

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	β -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 aryamidase	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA to LAP) (1) if necessary, decolorize with intense light Colorless or very pale orange Orange			
α GAL	6-Bromo-2-naphthyl α -D-galactopyranoside	α -galactosidase	Colorless		Violet	
β GUR	Naphthol AS-BI β -D-glucuronate	β -glucuronidase	Colorless		Blue	
β GAL	2-naphthyl- β -D- galactopyranoside	β -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	
RIB	Ribose	Acidification	4 hrs.	24 hrs.	4 hrs.	24 hrs.
ARA	L-Arabinose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
MAN	Mannitol	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
SOR	Sorbitol	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
LAC	Lactose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
TRE	Trehalose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
INU	Inulin	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
RAF	Raffinose	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
AMD	Starch (2)	Acidification	Red	Orange/Red	Orange/Yellow	Yellow
GLYG	Glycogen	Acidification	Red or Orange		Bright yellow	

(1) During a second reading after 24 hours of incubation, a deposit may be noticed in the tubes where the ZYM A and ZYM B reagents have been added. This phenomenon is normal and should not be taken into consideration.

(2) The acidification of starch is frequently weaker than that of other sugars.

(3) A pale pink color obtained after 10 minutes should be considered negative.

FIGURA 25 - Quadro utilizado para obtenção dos resultados do "kit" de identificação Api 20 *Strep*

API *Staph*

1. Descrição

API *Staph* (#2 050 0) é um sistema bioquímico para identificação de *Stafilococos* e *micrococos* baseados em 19 testes.

Cada “kit” contém 25 tiras de testes, recipiente de incubação, ampolas de meio API *Staph*, bloco de anotações para os resultados, manual de instrução API *Staph* e de dados. A identificação das cepas pode ser interpretada com “Analytical Profile Index” ou com o *software* APILAB. As tiras de testes API *Staph* e as ampolas devem ser armazenadas entre 2-8°C.

2. Materiais

a) Meio de API *Staph*

Extrato de Levedura.....	0,5g
Bactopeptone	10g
Cloreto de Sódio.....	5g
Elementos de identificação	10 mL
Água destilada qsp	1000 mL

PH:7,5

b) Reagentes

NIT 1 (#7 044 0)

Ácido Sulfanílico.....0,8g

Ácido acético 5 N.....100mL

NIT 2 (#7 045 0)

N-N-Dimetil-1-naftilamine.....7,00g

Ácido acético 5 N.....100mL

VP 1 (#7 042 0)

Hidróxido de Potássio40,0g

Água100mL

VP2 (#7 043 0)

α -naftol.....6g

Etanol100 mL

ZYM A (#7 047 0)

Tris-hidroximetil-aminometano25g

Ácido hidrocloreico11 mL

Sulfato de lauril sódio.....10g

Água100 mL

ZYM B (#7 048 0)

Azul rápido BB..... 0,35g

2-metoxietanol100 mL

h) Padrão de McFarland: 0.5 (#7 090 0)

i) Pipetas plásticas descartáveis estéreis

j) Óleo Mineral (#7 010 0)

k) *Swabs* estéreis

l) Placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado

3. Procedimentos para Identificação

Os microrganismos são subcultivados em placas contendo FAA + 5% de sangue de carneiro desfibrinado durante 18-24 horas a 37°C. A cultura pura das colônias bacterianas deve ser primariamente determinada pela morfologia das colônias, coloração de Gram, produção de catalase e requerimentos gasosos. Estes procedimentos permitem a identificação primária das cepas como cocos Gram-positivos, catalase positiva e aeróbios/anaeróbios facultativos.

Swab estéril é usado para inoculação do meio de inoculação do API *Staph*. Utiliza-se um inóculo moderado e a suspensão microbiana homogênea é ajustada com turbidez igual ao padrão de McFarland 0,5.

Cinco mL de água é adicionado no recipiente de incubação para se manter uma atmosfera úmida e a seguir coloca-se nele uma tira de testes API *Staph*.

Uma pipeta estéril é então introduzida no meio de API *Staph* e somente a porção inferior das cúpulas (testes VP a ADH), é preenchida com a suspensão, evitando a formação de bolhas.

Preencher as cúpulas dos testes (ADH) e (URE) com duas gotas de óleo mineral.

Tampar a tira e incubar o conjunto sob condições aeróbias a 37°C durante 18 horas. Após este período, adicionar os reagentes e anotar os resultados, comparando-os ao resultado padrão encontrado no manual de dados API *Staph*.

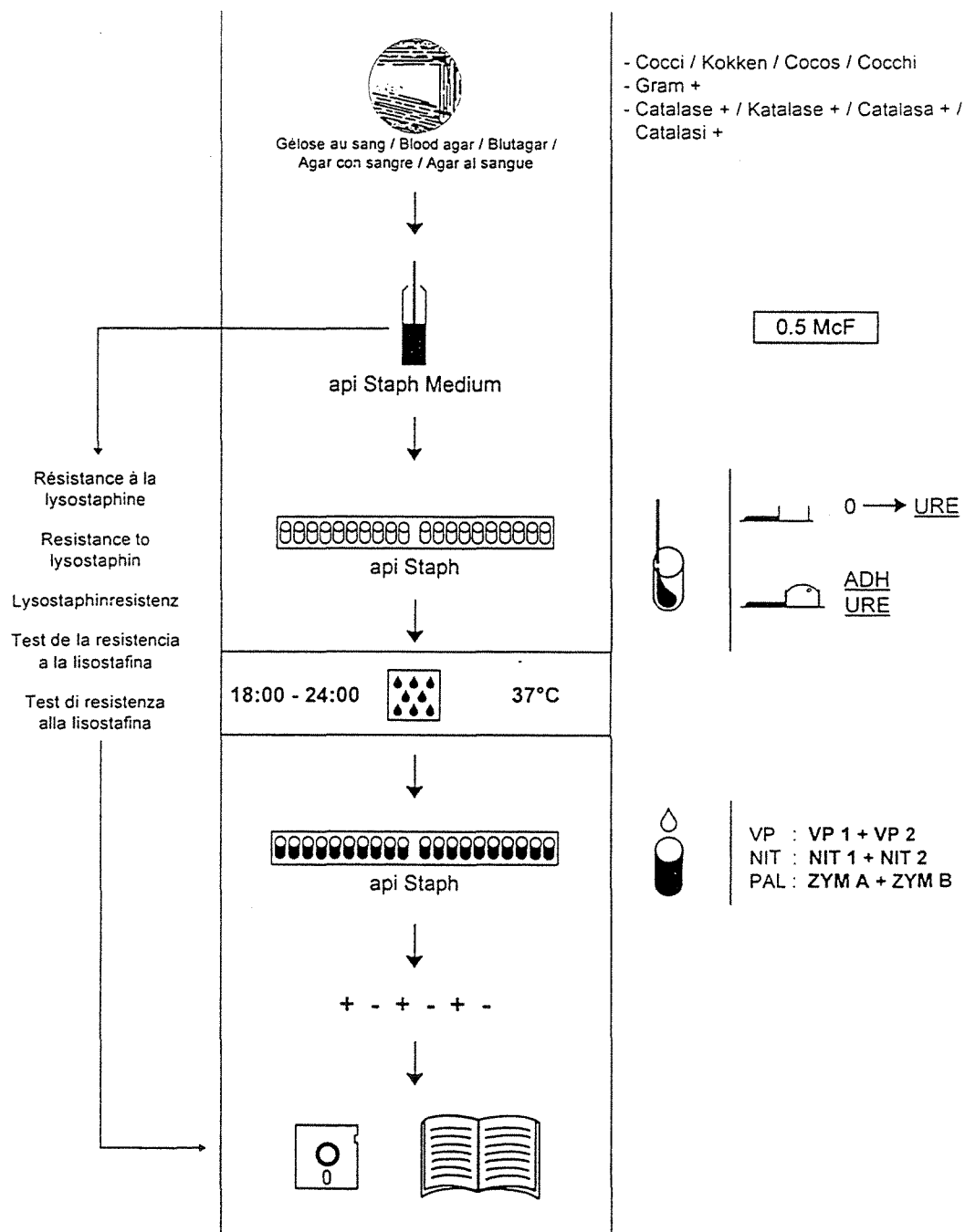


FIGURA 27 - Ilustração representativa dos procedimentos para identificação do “kit” de identificação *Api Staph*

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

The acidification tests should be compared to the negative (0) and positive (GLU) controls.

When MNE and XLT are preceded or followed by positive tests, then an orange test should be considered negative.

FIGURA 28 – Quadro utilizado para obtenção dos resultados do “kit” de identificação Api *Staph*

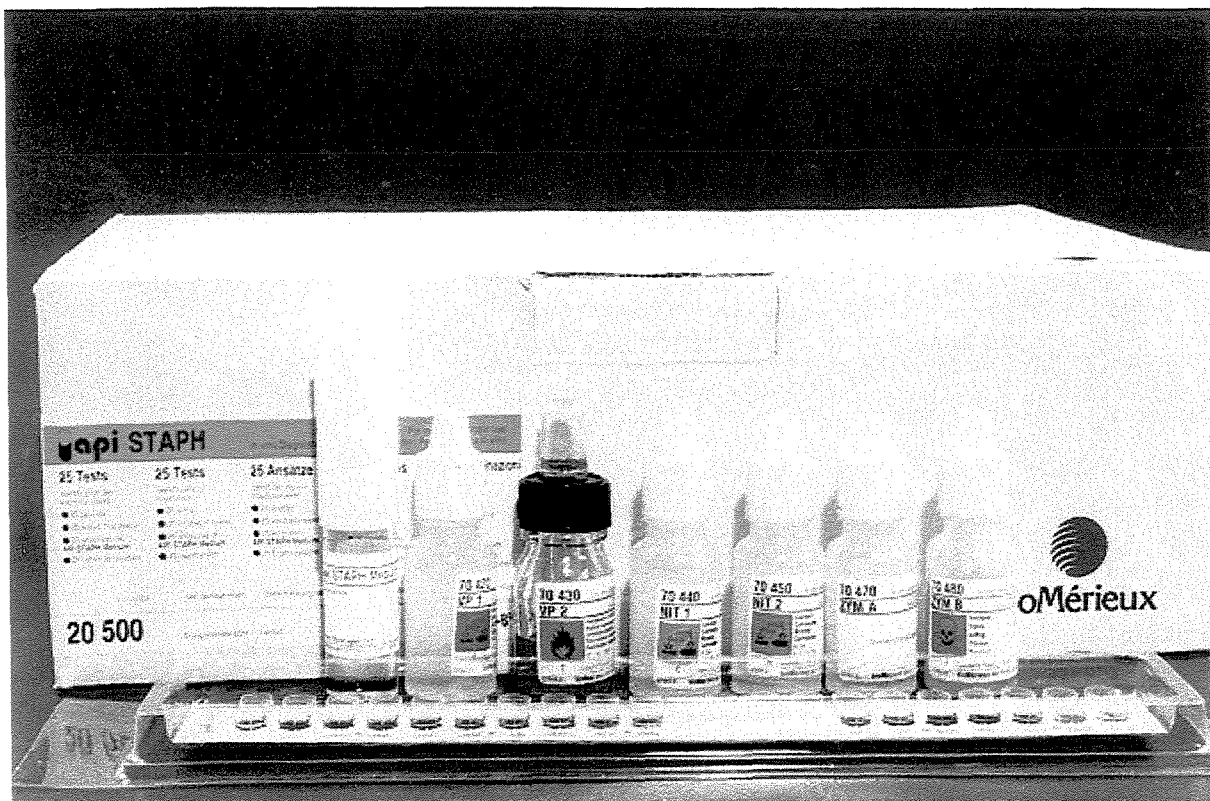


FIGURA 29 - Embalagem do “kit “ de identificação API Staph e reagentes utilizados

FIGURA 30 – Ficha de resumo com os aspectos clínicos e radiográficos dos 30 pacientes com canais radiculares associados a abscessos periapicais.

P	SEX	DEN	DOR	HD	DPA	DP	TEP	NEC	H	RES	CAR	AB	ED	LES	EXS	FIS	MOB	ABS
1	F	32	S	N	N	N	N	S	N	DEF	N	N	N	S	P	S	N	FZ
2	M	45	S	N	S	S	N	S	N	DEF	N	N	S	N	C	N	N	SMD
3	M	45	S	N	N	S	N	S	N	PRO	N	N	N	N	P	N	N	IO
4	F	26	N	S	S	S	N	S	N	DEF	N	N	S	S	P	S	N	FZ
5	F	15	S	N	S	S	N	S	N	A	S	N	N	S	H	N	N	SP
6	F	12	S	N	S	S	N	S	N	DEF	N	N	S	S	P	N	N	SML
7	F	11	S	S	S	S	N	S	N	DEF	N	N	S	N	Se	N	N	SMD
8	F	36	S	N	S	S	N	S	N	DEF	N	N	S	N	Se	N	S	SP
9	M	46	S	N	S	S	N	S	N	A	S	N	S	S	P	N	N	SMD
10	F	41	N	S	N	S	N	S	N	PRO	N	N	N	S	H.P	S	S	FZ
11	M	48	S	N	S	S	N	S	N	DEF	N	N	S	S	Se	N	N	SMD
12	M	15	S	N	S	S	S	N	N	DEF	N	N	S	S	P	N	N	SMD
13	M	22	S	N	S	S	N	S	N	PRO	S	N	S	S	P	N	N	SP
14	F	44	S	N	S	S	N	S	N	A	S	N	S	S	P	N	N	SMD
15	F	21	S	N	S	S	N	S	N	A	S	N	S	S	P	N	S	SML
16	M	46	S	S	S	S	N	S	N	PRO	N	N	S	S	Se	N	N	SMD
17	M	21	N	S	S	S	N	S	N	A	S	N	S	S	P	N	S	SML
18	F	12	N	S	N	N	N	S	N	DEF	N	N	S	S	P	S	N	FZ
19	M	23	S	S	S	S	N	S	N	A	S	N	S	N	Se	N	N	SMD
20	F	26	S	N	S	S	N	S	S	A	N	N	S	N	P	N	N	SMD
21	M	41	S	N	S	N	N	S	N	DEF	N	N	S	S	P	S	N	FZ
22	F	35	S	N	S	N	N	S	N	DEF	N	N	S	S	H	N	S	SMD
23	M	14	S	N	N	S	N	S	N	DEF	N	N	S	N	Se	N	N	SP
24	F	46	S	N	S	S	N	S	N	A	N	S	S	S	Se	N	N	SMD
25	F	45	N	S	S	S	N	S	S	A	N	N	S	S	S	N	N	SML
26	F	46	S	N	S	S	N	S	N	DEF	N	N	S	S	H.P	N	N	SMD
27	M	21	S	N	S	S	N	S	N	DEF	N	N	N	S	Se	N	N	SP
28	M	11	S	N	S	S	N	S	N	PRO	N	N	S	S	Se	N	N	SMD
29	F	22	N	N	N	N	S	N	N	PRO	N	N	N	S	Se	S	N	FZ
30	F	45	S	N	N	S	S	N	N	A	N	S	N	S	P	N	S	IO

S=sim; N=não

P=paciente; SEX=sexo-F= feminino, M=masculino; DEN=dente; HD=história de dor; DPA=dor à palpação; DP=dor à percussão; TEP=tratamento endodôntico prévio; NEC=necrose; H=hígido; RES=restauração-DEF=definitiva, PRO=provisória, A=ausente; CAR=cariado; AB=aberto; ED=edema; LES=lesão; EXS=exsudato, P=purulento, H=hemorrágico, C=claro, Se=seco; FIS=fístula; MOB=mobilidade; ABS=abscesso, SP=subperióstico, SMD=submucoso difuso, SML=submucoso localizado, IO=Intra-ósseo, FZ=fistulização.

FIGURA 31 - Ficha de resumo com os achados microbiológicos dos 30 pacientes com canais radiculares associados a abscessos periapicais e a localização clínica dos respectivos abscessos encontrados.

P*	Abs	Microrganismos
1	FZ	<i>Actinomyces viscosus</i>
2	SMD	<i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Gemella haemolysans</i>
3	IO	<i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus anginosus</i>
4	FZ	<i>Clostridium acetobutylicum</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus anginosus</i>
5	SP	Não houve crescimento bacteriano
6	SML	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Gemella haemolysans</i>
7	SMD	<i>Eubacterium lentum</i> , <i>Aerococcus viridans</i>
8	SP	<i>Lactobacillus lactis</i>
9	SMD	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Enterococcus faecium</i>
10	FZ	<i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
11	SMD	<i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i>
12	SMD	<i>Streptococcus acidominus</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i>
13	SP	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Clostridium subterminale</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Gemella haemolysans</i>
14	SMD	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> , <i>Eubacterium aerofaciens</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i>
15	SML	<i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Peptostreptococcus tetradius</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Neisseria spp.</i>
16	SMD	<i>Streptococcus mitis</i>
17	SML	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>
18	FZ	<i>Bacteroides gracilis</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Clostridium hastiforme</i> , <i>Lactobacillus Lactobacillus minute</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus intermedius</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bacteroides spp.</i>
19	SMD	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella loescheii</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Clostridium subterminale</i> , <i>Lactobacillus spp.</i>
20	SMD	<i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus constellatus</i>
21	FZ	<i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Veillonella spp.</i> , <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> , <i>Tissierella praeacuta</i> , <i>Peptostreptococcus spp.</i>
22	SMD	<i>Prevotella corporis</i> , <i>Prevotella oris</i> , <i>Bacteroides gracilis</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Tissierella praeacuta</i>
23	SP	<i>Prevotella buccae</i> , <i>Prevotella corporis</i> , <i>Peptostreptococcus maanus</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Gemella morbillorum</i>
24	SMD	<i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Lactobacillus acidominus</i> , <i>Gemella haemolysans</i> , <i>Staphylococcus saccharolyticus</i> , <i>Capnocytophaga spp.</i>
25	SML	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Gemella morbillorum</i>
26	SMD	<i>Prevotella loescheii</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Veillonella spp.</i>
27	SP	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella corporis</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Fusobacterium Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus constellatus</i>
28	SMD	<i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Gemella morbillorum</i>
29	FZ	<i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Enterococcus spp.</i>
30	IO	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Veillonella spp.</i> , <i>Streptococcus mutans</i>

*P=paciente; Abs=abscesso, SP= Subperiósteo, SMD=Submucoso difuso, SML=submucoso localizado, FZ=fistulização, IO=intra-ósseo