



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



C2

MARAISA GREGGIO DELBONI

Identificação de microrganismos presentes na saliva, na coroa e no canal radicular de dentes associados ao insucesso endodôntico e suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* isolados dos canais radiculares

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a resolução CCPG 036/83.
CPG 09.09.07
Assinatura do Orientador

Tese apresentada à faculdade de Odontologia de Piracicaba – Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica – Área de Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

PIRACICABA

2006

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

UNIDADE BU
Nº CHAMADA FUNILCARIP
2376i
V EX
TOMBO BC/ 21008
PROC. 4507
C D X
PREÇO 11,00
DATA 15/03/07
BIB-ID 402959

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª / 6159

D376i Delboni, Maraisa Greggio.
Identificação de microrganismos presentes na saliva, na coroa e no canal radicular de dentes associados ao insucesso endodôntico e suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* isolados dos canais radiculares. / Maraisa Greggio Delboni. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.

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

1. Endodontia. 2. Microbiologia. 3. Antibióticos. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
(mg/fop)

Título em Inglês: Identification of microorganisms isolated from saliva, crown and root canal of teeth with endodontic failure and antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis*

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Endodontics. 2. Microbiology. 3. Antibiotics

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Mestre em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Alexandre Augusto Zaia, Carlos Eduardo da Silveira Bueno

Data da Defesa: 14-12-2006

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 14 de Dezembro de 2006, considerou a candidata MARAISA GREGGIO DELBONI aprovada.

PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF. DR. CARLOS EDUARDO DA SILVEIRA BUENO

PROF. DR. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

200710906

DEDICATÓRIA

**Dedico esta dissertação à minha família,
por ser a razão das minhas realizações.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, cuja proteção me permitiu a realização deste trabalho.

Aos meus pais, **Toninho e Elaine**, pela oportunidade que me deram de estudar.

À família, **Gustavo, Andréia e Pedro, Luciano, Lígia e Arthur, Vó Maria e Tio Ailton, Tio Everaldo e Tia Luly, Nádia e Everaldinho**, pelo incentivo.

Ao **Fabrcício e família**, pelo carinho e atenção.

À **Prof.^a. Dr.^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, minha orientadora e amiga, pela oportunidade de estagiar no Laboratório de Endodontia da FOP-UNICAMP, pelo privilégio de ser sua orientada e participar de sua equipe, pelos ensinamentos e orientações em pesquisas, pelo exemplo de competência, pelo incentivo aos futuros projetos de pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silveira Bueno**, meu primeiro mestre de Endodontia, pelas suas orientações, apoio, amizade e pela condução dos primeiros projetos de pesquisa na graduação e especialização, os quais se tornaram meus primeiros artigos publicados e abriram as portas da pósgraduação.

Ao **Prof. Dr. Luiz Valdrighi**, pela transmissão de sua valiosa sabedoria.

Aos professores de Endodontia da FOP-UNICAMP, **Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**.

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba**, da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter** pela atenção aos alunos.

Aos Professores de Microbiologia da FOP-UNICAMP, **Prof. Dr. José Francisco Höfling, Prof. Dr. Reginaldo B. Gonçalves**, pela amizade.

À banca de qualificação: **Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade, Prof. Dr. Reginaldo B. Gonçalves e Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida** pelas correções desta dissertação.

Aos colegas do curso de Mestrado **Danna Moreira, Ana Carolina Lima, Frederico Martinho**.

À amiga **Flaviana Ferreira**, por ter me acolhido em Piracicaba, pela amizade e ensinamentos.

À amiga **Morgana Eli Vianna**, pela amizade e pelos ensinamentos em pesquisa.

À amiga **Vanessa Bellocchio Berber**, pela amizade, sinceridade e companheirismo.

Aos colegas de pós-graduação **Helena Rabang, Cícero Gadê Neto, Ericka Pinheiro, Ezilmara de Souza, Tétis Sauáia, Nilton Vivacqua Gomes, Douglas Cortez, Daniel Oliveira, Fábio Dametto, Rogério de Castilho, Iadasa de Quadros, Adriana Soares, Luciano Cintra, Thaís Accorsi, Juliana Santos, José Flávio Almeida, Renata Bruzadelli**.

Aos estagiários e amigos **Giselle Cruz Abi Rached e Francisco Montagner**, pelo carinho, atenção e ajuda.

À aluna de iniciação científica **Priscila Fortes**.

Aos amigos **Cecília Pereira e Aníbal Luna**, pelo carinho.

Aos funcionários **Wanderly Almeida, Geovânia Caldas, Rubens Payão, Adailton Lima, Denize de Pinho, Maria Aparecida Riva**, pela amizade e auxílio.

Aos técnicos de laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura da FOP-UNICAMP, **Eliene Narvaes Romani e Adriano Luiz Marins**, pelo auxílio e prontidão.

Aos amigos **Malina Sêga, Vera Schutz e Geraldo**, pela amizade e confiança.

À **Rebecca Bohde**, pelo auxílio e correções dos textos em inglês.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro.

Enfim, a todos que, de forma direta ou indireta, participaram da minha vida neste período.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi identificar *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias na saliva e a microbiota do material restaurador e dos canais radiculares de 30 pacientes que apresentavam algum dente com insucesso endodôntico e estudar a suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *E. faecalis* isoladas dos canais radiculares destes pacientes. A metodologia utilizou meio de transporte, cultura e incubação que propiciaram o crescimento de bactérias anaeróbias estritas e facultativas e diversos meios seletivos para isolamento de *Enterococcus* spp., enterobactérias, leveduras e fungos. Do total de 114 espécies bacterianas isoladas nos canais radiculares, 81,5% eram bactérias anaeróbias facultativas, 18,5% anaeróbias estritas, 86% Gram-positivas e 14% Gram-negativas. Os gêneros bacterianos isolados dos canais radiculares foram: *Staphylococcus* (15/50%), *Streptococcus* (11/36,7%), *Actinomyces* (12/40%), *Enterococcus*, *Gemella* (8/26,7%), *Propionibacterium*, *Clostridium* (4/13,3%), *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* (3/10%), *Lactobacillus*, *Prevotella* (2/6,7%), *Candida* (1/3,3%). *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias foram isolados em 26,7%, 50%, 3,3% e 16,7% dos canais radiculares, em 20%, 40%, 6,7 % e 13,3% das coroas e em 43,3%, 56,7%, 50% e 26,7% da saliva, respectivamente. As cepas de *E. faecalis* isoladas (8/30) foram testadas através do método E-test, sendo 100% suscetíveis à amoxicilina + ácido clavulânico e à gentamicina, 87,5% suscetíveis à amoxicilina e moxifloxacina e 60% à ciprofloxacina. Entretanto, 100% das cepas foram resistentes à clindamicina e metronidazol, 87,5% à azitromicina e rifampicina. Conclui-se que a microbiota de dentes com insucesso endodôntico é composta principalmente por bactérias anaeróbias facultativas, predominantemente Gram-positivas. Os gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp. e *E. faecalis* foram os mais prevalentes em canais radiculares. *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias foram identificados na saliva, na coroa e nos canais radiculares. Os antimicrobianos mais efetivos contra *E. faecalis* foram amoxicilina + ácido clavulânico e gentamicina.

Palavras-chave: endodontia, microbiologia, antibióticos.

ABSTRACT

The aim of this study was to identify *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. and enterobacteria in the saliva, to identify microorganisms in the restorative material of the crown and in the root canal of 30 failed endodontically treated teeth with periradicular lesion and to test antibiotic susceptibility of *E. faecalis* isolates from obtured root canal. The transport media, specific culture media and adequate gaseous requirement were used to isolate as many as strict and facultative anaerobes as possible. Selected media were used to isolate *Enterococcus* spp., enterobacteria and yeasts. From the 114 microorganisms isolated from the root canals, 81.5% were facultative anaerobes and 18.5% strict anaerobes, 86% were Gram-positive and 14% Gram-negative microorganisms. The most frequently bacterial genera recovered from the root canals were: *Staphylococcus* (15/50%), *Streptococcus* (11/36.7%), *Actinomyces* (12/40%), *Enterococcus*, *Gemella* (8/26.7%), *Propionibacterium*, *Clostridium* (4/13.3%), *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* (3/10%), *Lactobacillus*, *Prevotella* (2/6.7%) and *Candida* (1/3,3%). *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. and enterobacteria were isolated in 26.7%, 50%, 3.3% and 16.7% of the canals, in 20%, 40%, 6.7% and 13.3% of the crown and in 43.3%, 56.7%, 50% and 26.7% of saliva, respectively. Antibiotic sensitivity of *Enterococcus faecalis* isolates (8/30) were tested for their susceptibility/resistance and it was accomplished with the E-test System. *Enterococcus faecalis* were 100% susceptible to amoxicillin combined with clavulanate, gentamicin, 87.5% to amoxicillin and moxifloxacin and 60% to ciprofloxacin. However, 100% of the *E. faecalis* isolates were resistant to clindamycin and to metronidazole, 87.5% to azithromycin and rifampicin. It was concluded that root canals with failed endodontic therapy comprise predominantly facultative anaerobic Gram-positive microorganisms. Moreover, *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. and enterobacteria could also be detected in the saliva and in the root canals. The effective antibiotics for *E. faecalis* were amoxicillin combined with clavulanate and gentamicin.

Key-words: endodontics, microbiology, antibiotics.

SUMÁRIO

	Páginas
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
Índice de sucesso do tratamento e do retratamento endodôntico	7
Fatores associados ao insucesso endodôntico	8
Microrganismos relacionados às infecções endodônticas persistentes	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	16
<i>Staphylococcus</i> spp.	18
<i>Propionibacterium e Actinomyces</i>	19
Enterobactérias	20
Fungos	21
Infecção extracanal	22
PCR (Polimerase Chain Reaction)	24
Infiltração coronária	26
Microbiota da saliva / Ecosistema bucal	28
Outros fatores associados ao insucesso endodôntico	30
Tratamento do insucesso endodôntico	31
O uso de antibióticos sistêmicos como complemento à terapêutica de casos de insucessos endodônticos	32
Antibióticos: mecanismo de ação e resistência	36
<i>Penicilinas</i>	36
<i>Lincosaminas</i>	40
<i>Macrolídeos</i>	41
Testes de suscetibilidade antimicrobiana	44
<i>E-test</i>	45
Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções endodônticas	47
3. PROPOSIÇÃO	53
4. MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1. Coleta das amostras	56
4.2. Processamento das amostras	58

4.3.	Cultivo, isolamento, incubação e identificação dos microrganismos	60
4.4.	Teste de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> isoladas dos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente	63
4.5.	Análise estatística	65
5.	RESULTADOS	67
6.	DISCUSSÃO	79
	Suscetibilidade antimicrobiana de <i>Enterococcus faecalis</i> isolados	85
7.	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	91
	ANEXOS	
I	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	105
II	Certificado do comitê de ética	109
III	Quadro dos aspectos clínicos e radiográficos	111
IV	E-TEST	115
V	Meio de Transporte VMGA III	117
VI	Teste da Catalase e Oxidase	121
VII	Meios de cultura	123
VIII	Câmara de anaerobiose	127
IX	Kits de identificação bacteriana (BIOMERIEUX)	129

1. INTRODUÇÃO

O insucesso do tratamento endodôntico está associado ao aparecimento ou à persistência de uma infecção periapical. Pode ser detectado por exame radiográfico através da observação de rarefações ósseas periapicais, as quais permaneceram inalteradas, aumentaram ou somente diminuíram de tamanho ou surgiram após o tratamento endodôntico, ou através de sinais e/ou sintomas clínicos do dente tratado endodonticamente (Strindberg *et al.*, 1956). Portanto a preservação do tratamento endodôntico deve ter um acompanhamento clínico e radiográfico por um período de no mínimo 4 anos (Strindberg *et al.*, 1956; Engström *et al.*, 1964; Sjögren *et al.*, 1997).

A maioria dos casos de fracasso do tratamento endodôntico ocorre devido a procedimentos clínicos insatisfatórios e a dificuldade de eliminação da infecção (Nair *et al.* 1999). Assim, o insucesso pode estar relacionado com canais não detectados, portanto não tratados, falhas na instrumentação, falta de controle asséptico durante o tratamento, acidentes ocorridos durante o acesso à câmara pulpar e/ou durante a instrumentação do canal radicular, obturações e restaurações inadequadas do dente que sofreu intervenção endodôntica.

Mesmo em casos de canais radiculares bem tratados, algumas bactérias podem permanecer vivas, devido à complexidade anatômica do sistema de canais radiculares (Ida & Gutmann, 1995). Bactérias presentes em regiões de istmos, ramificações, reentrâncias, túbulos dentinários, reabsorções apicais externas, podem não ser afetadas pelas medidas usadas na desinfecção endodôntica (Nair, 1987; Nair *et al.*, 1990a, 1999).

Os microrganismos resistentes ao tratamento endodôntico que se proliferam no canal radicular, ou aqueles que contaminam o canal após o tratamento endodôntico através das infiltrações coronárias, são os principais responsáveis pelo fracasso do tratamento endodôntico (Malooley *et al.*, 1979; Pitt Ford, 1982; Lin *et al.*, 1991, 1992; Dahlén & Mölller, 1992; Cheung, 1996; Siqueira Jr & Lopes, 1999).

A falta de uma restauração coronária satisfatória promove uma fonte constante de agentes que podem iniciar e manter a infecção periapical contribuindo com o insucesso do tratamento do sistema de canais radiculares (Saunders & Saunders, 1994).

Portanto, há necessidade de estudos comparando a microbiota do canal radicular de dentes com insucesso endodôntico com o ecossistema bucal através da saliva do mesmo paciente, relacionando fatores clínicos e radiográficos e investigando a possibilidade de uma verdadeira infiltração coronária ou contaminação externa no trans-operatório.

Allen *et al.* (1989) e Hepworth & Friedman (1997), analisando o sucesso do retratamento endodôntico, encontraram uma taxa de aproximadamente 66%. Esse índice se apresenta modesto quando comparado com a alta taxa de sucesso do tratamento endodôntico - 85% a 96% (Swatz *et al.*, 1983; Sjögren *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1993). O menor índice de sucesso do retratamento endodôntico pode indicar, além de dificuldades técnicas devido a fatores iatrogênicos do tratamento anterior, uma dificuldade na eliminação da microbiota mais resistente presente nos dentes com insucessos do tratamento endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998). Um estudo criterioso das bactérias associadas ao fracasso do tratamento endodôntico poderia nos levar a um progresso das técnicas de desinfecção endodôntica e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso do retratamento.

Estudos sobre a natureza das infecções dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais têm aumentado nos últimos cinco anos como podemos notar na literatura (Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Rolph *et al.*, 2001; Egan *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2003a; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004; Adib *et al.*, 2004). Poucos estudos anteriores a 2000 (Möller, 1966; Gomes *et al.*, 1996c; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998) revelaram que a microbiota de canais radiculares de dentes com fracasso do tratamento endodôntico era diferente daquela encontrada em canais radiculares de dentes com polpas necrosadas e não tratados endodonticamente.

A particularidade da microbiota encontrada nos canais com tratamento endodôntico prévio que fracassaram deve-se a um processo de seleção dependente da resistência específica de determinados microrganismos ao preparo químico-mecânico e à medicação intra-canal utilizada durante a terapia endodôntica, e da capacidade de sobrevivência em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são mínimas (Sundqvist *et al.*, 1998).

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

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

Embora antibióticos não sejam comumente usados para o tratamento endodôntico de doenças crônicas, como no caso de lesões perirradiculares persistentes ao tratamento endodôntico, em pacientes de risco eles se tornam um importante complemento à terapêutica endodôntica durante o retratamento, assim como em casos de reagudização e sintomatologia e/ou exsudato persistente (Abbott *et al.*, 1990; Grad, 1997).

O tratamento desses casos pode ser auxiliado pela determinação da sensibilidade antimicrobiana das bactérias patogênicas. Porém, como esses resultados demoram mais de 48 horas - para isolamento de bactérias e testes de sensibilidade antimicrobiana - devemos obter, para aplicação da terapêutica clínica, um conhecimento das bactérias envolvidas nesses casos de insucesso e um padrão de sensibilidade dessas bactérias aos antibióticos (Abbott *et al.*, 1990). Entretanto esses padrões mudam com a possibilidade de surgimento de bactérias resistentes, o que torna importante o monitoramento desse padrão através de testes de sensibilidade antimicrobiana, permitindo o desenvolvimento de métodos de ação para um tratamento mais eficaz (Finegold *et al.*, 1988; Rosenblatt & Brook, 1993; Forbes *et al.*, 1998).

2. REVISÃO DA LITERATURA

Bactérias presentes no interior dos canais radiculares constituem os principais agentes etiológicos da inflamação periapical (Takehashi *et al.*, 1965; Möller *et al.*, 1981; Takahashi, 1998). Na maioria dos casos, o insucesso do tratamento endodôntico ocorre devido a procedimentos clínicos insatisfatórios de controle e eliminação da infecção (Nair *et al.*, 1999), como a falta de controle asséptico durante o tratamento, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, falhas na instrumentação, obturações inadequadas, e restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o tratamento endodôntico (Cheung, 1996).

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

Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium* são frequentemente isoladas de canais radiculares infectados (Sundqvist, 1989, 1992a, b; Baumgartner, 1991; Baumgartner & Falker, 1991; Sato *et al.*, 1993; Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994, 1996a, b, c). Porém, estudos têm revelado que a microbiota de dentes com fracasso do tratamento endodôntico (Möller, 1966; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998) difere daquela encontrada em canais radiculares de dentes com polpas necrosadas, os quais se caracterizam pela presença de uma microbiota mista e polimicrobiana, comumente em combinações de 4 a 7 espécies, predominantemente anaeróbia estrita, com um relativo equilíbrio entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Sundqvist, 1989, 1992a, b; Baumgartner, 1991; Baumgartner & Falker, 1991; Sato *et al.*, 1993; Gomes *et al.*, 1994; Gomes, 1995; 1996a, b, c, 1997; Baumgartner *et al.*, 1999).

As bactérias presentes nos canais de dentes tratados endodonticamente que fracassaram podem ser originalmente derivadas da infecção primária (Fukushima *et al.*, 1990; Sjögren *et al.* 1997), ou introduzidas no canal por procedimentos inadequados

durante o tratamento endodôntico (Siren *et al.*, 1997), ou ainda, penetrarem no canal através de um selamento coronário inadequado (Cheung, 1996).

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

Para resolução dos casos de insucesso existem duas modalidades de tratamento: o retratamento endodôntico e a cirurgia periapical. Estudos indicam o retratamento convencional como primeira opção de tratamento nos casos de insucesso (Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997; Ruddle, 1997). Vale ressaltar que a realização do retratamento convencional, prévio a cirurgia periapical, aumenta o índice de sucesso da mesma (Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997). Assim, considerando-se que o retratamento é uma intervenção de alta ocorrência e que apresenta índice de sucesso inferior ao da intervenção primária, torna-se importante uma rigorosa avaliação dos fatores que originaram tal fracasso, para que se possa planejar o tratamento mais adequado para o caso, entre eles: retratamento, novo retratamento, cirurgia parentodôntica, proervação, ou a associação das mesmas.

O tempo de proervação pós-tratamento endodôntico para determinar sucesso/insucesso varia entre os autores. Estudos têm indicado um período mínimo de 4

anos pós-tratamento endodôntico (Strindberg *et al.*, 1956; Engström *et al.*, 1964; Sjögren *et al.*, 1997), enquanto outros recomendam 2 anos (Bender *et al.*, 1966; Bergenholtz *et al.*, 1979), 1 ano e meio (Friedman *et al.*, 1995) e 1 ano (Reit, 1987).

Índice de sucesso do tratamento e do retratamento endodôntico

O tratamento endodôntico apresenta uma alta taxa de sucesso, mas a presença da lesão periapical, influencia no prognóstico do tratamento endodôntico. Swartz *et al.* (1983) analisaram o sucesso endodôntico de 1.007 dentes após 20 anos do tratamento endodôntico, e encontraram uma taxa de sucesso de 87,79%.

Sjögren *et al.* (1990), em uma avaliação clínico-radiográfica de 356 dentes após 8 a 10 anos do tratamento endodôntico, reportaram uma taxa de sucesso de 62% em casos de retratamento endodôntico de dentes com lesões periapicais. Entretanto, verificaram um índice de sucesso do tratamento endodôntico em 86% dos dentes com polpa necrosada e lesão periapical, e em 96% dos dentes com polpas vitais e não-vitais sem lesão periapical.

Smith *et al.* (1993), em estudo retrospectivo analisaram dentes após 5 anos do tratamento endodôntico e encontraram um taxa de sucesso de 84,29%, representando 692 de 821. Friedman *et al.* (1995), verificaram um índice de sucesso de 97% em casos de dentes sem lesões periapicais, enquanto em dentes com lesões, o reparo estava presente em apenas 63,2% dos casos.

A menor taxa de sucesso do retratamento endodôntico, quando comparado ao tratamento endodôntico de polpas necrosadas, tem sido relacionada a dificuldades técnicas devido a fatores iatrogênicos cometidos no tratamento endodôntico anterior (Lewis & Block, 1988).

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

Molander *et al.* (1998) ressaltaram que essas baixas taxas de sucesso podem indicar uma dificuldade na eliminação da microbiota presente nos dentes com tratamento endodôntico prévio, que representa um grupo limitado de microrganismos altamente resistentes à terapêutica do tratamento endodôntico. Os autores concluíram em seu estudo

que as estratégias do retratamento convencional deveriam ser reconsideradas, e sugeriram que fossem realizados mais estudos sobre a microbiota de dentes tratados endodonticamente, sua composição e suscetibilidade a substâncias medicamentosas utilizadas no tratamento, com o objetivo de elevar os índices de sucesso.

Fatores associados ao insucesso endodôntico

Além dos problemas anatômicos, que consistem em áreas inacessíveis à instrumentação, o fracasso endodôntico pode advir da resistência de determinadas bactérias aos métodos químicos e mecânicos utilizados na terapia endodôntica convencional. Casos de acidentes, como desvios, degraus, perfurações, instrumentos fraturados e sobre-obturações, usualmente resultam em fracasso quando associados a um processo infeccioso (Siqueira Jr. & Lopes, 1999).

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

Lin *et al.* (1991) estudaram através de avaliação clínica, radiográfica e histobacteriológica 150 casos com insucesso do tratamento endodôntico, e detectaram bactérias em 69% dos dentes, presentes principalmente no interior dos canais radiculares, estando relacionadas com a severidade da infecção periapical.

De acordo com Dahlén & Möller (1992), as falhas do tratamento endodôntico não podem, por si só, causar ou manter a inflamação periapical. Entretanto, a obturação incompleta do canal radicular favorece a persistência de microrganismos e seus produtos em espaços vazios permitindo a permanência da infecção e conseqüentes danos aos tecidos periapicais. Além desse fator, uma obturação incompleta é resultante de uma instrumentação inadequada, o que proporciona a manutenção de tecidos necróticos e microrganismos no interior do sistema de canais radiculares.

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

Gomes *et al.* (1996b) estudaram a suscetibilidade da microbiota dos canais radiculares ao preparo químico-mecânico, e relataram que a terapia endodôntica não foi capaz de eliminar todas as bactérias, apresentando algumas espécies mais resistentes do que outras, como por exemplo, *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Sjögren *et al.* (1997) estudaram a relação entre a presença de bactérias no canal radicular no momento da obturação e o sucesso do tratamento endodôntico em 55 dentes com periodontite apical. Após a realização das coletas microbiológicas, os canais foram obturados na mesma sessão, e foram preservados por um período de 5 anos. Os dentes com cultura negativa após a instrumentação apresentaram sucesso em 94% dos casos, enquanto nos dentes com cultura positiva, o sucesso era de apenas 68%. Os autores verificaram que 2 casos que resultaram em fracasso endodôntico, apresentavam *Actinomyces israelii* nos canais radiculares no momento da obturação. A análise histológica das lesões periapicais desses dentes revelou a presença dessa bactéria nos tecidos periapicais, caracterizando uma actinomicose periapical. Os autores ressaltaram que essas bactérias resistentes ao preparo químico-mecânico, se permanecerem viáveis, podem manter a inflamação periapical, sendo um importante fator no insucesso do tratamento endodôntico.

Gutiérrez *et al.* (1999), através da análise, em microscopia eletrônica de varredura, de dentes com lesões periapicais e limas endodônticas ultrapassando o ápice ou canais sobre-obturados, demonstraram a presença de bactérias nas espirais das limas que ultrapassavam o forame apical, e principalmente na superfície radicular ao redor do forame apical, aderidas nas lacunas de reabsorção radicular. No grupo controle, que consistia de dentes com polpas vitais, sobre-instrumentados e sobre-obturados, nenhuma bactéria foi detectada na superfície das limas, no ápice, ou no cone de guta-percha extruído além do ápice.

Chávez de Paz (2003) relataram a prevalência de bactérias Gram-positivas após o preparo químico-mecânico (85%), e a presença de outras espécies além dos *Enterococcus* spp., especialmente *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. Estudos têm demonstrado a persistência de espécies de *Staphylococcus* spp. após a realização do preparo químico-mecânico dos canais radiculares (Goldman & Pearson, 1969; Gomes *et al.*, 1996b).

Algumas bactérias relacionadas a infecções endodônticas persistentes também foram encontradas após o preparo químico-mecânico, sendo *Enterococcus faecalis* freqüentemente isolados desses canais radiculares (Bender & Seltzer, 1952; Engström, 1964; Goldman & Pearson, 1969; Cavalleri *et al.*, 1989; Gomes *et al.*, 1996b, Chávez de Paz, 2003).

Microrganismos relacionados às infecções endodônticas persistentes

Microrganismos sobreviventes às medidas de desinfecção podem manter-se viáveis, dependendo da quantidade de nutrientes disponíveis e da capacidade de sobreviver em condições de carência nutricional, além disso, somente resultarão em fracasso endodôntico se tiverem acesso aos tecidos periapicais, se forem patogênicos e se estiverem em número suficiente para induzir ou perpetuar uma lesão periapical (Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1996b; Lopes *et al.*, 1999).

Estudos recentes realizados pelo método de cultura (Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Adib *et al.*, 2004) mostraram que a microbiota de canais com insucesso do tratamento endodôntico difere daquela encontrada em dentes necrosados (Sundqvist, 1989, 1992a, b; Baumgartner, 1991; Baumgartner & Falker, 1991; Sato *et al.*, 1993; Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994; Gomes 1996 a,b,c; Baumgartner *et al.*, 1999), tanto quantitativamente quanto qualitativamente, sendo caracterizada por monoinfecções com predominância de bactérias anaeróbias facultativas.

O número de espécies bacterianas isoladas de casos de retratamento está provavelmente relacionado à qualidade do tratamento endodôntico inicial. Dentes com tratamentos endodônticos de má qualidade, isto é, dentes com obturações muito aquém do ápice ou com falhas, apresentam uma microbiota similar àquela encontrada nos dentes não-

tratados, os quais contêm um maior número de espécies bacterianas. (Sundqvist *et al.*, 1998)

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

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

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

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

frequêntes. *Enterococcus faecalis* foi isolado em 29% dos casos que apresentavam culturas positivas.

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

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

a microbiota oral, as bactérias isoladas eram derivadas de microrganismos que colonizaram o canal antes ou durante o tratamento endodôntico.

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

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

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

Molander *et al.* (1998) analisaram o estado microbiológico de 100 dentes tratados endodonticamente com periodontite apical visível radiograficamente. Os dentes estudados apresentavam-se assintomáticos, e com a obturação do canal apresentando uma distância máxima de 5 mm do ápice radiográfico. A remoção do material obturador foi realizada utilizando brocas de Gates-Glidden e limas endodônticas, e em 21 casos, foi utilizado clorofórmio como material solvente da guta-percha. Os resultados mostraram que bactérias

estavam presentes em 68 dentes, porém o uso do clorofórmio foi considerado um fator influente, diminuindo o crescimento bacteriano. Dos 21 casos onde foi utilizado o clorofórmio, houve crescimento bacteriano em apenas 10 casos (47,3%), enquanto nos 79 dentes restantes o crescimento foi detectado em 58 canais (73,4%). Um total de 117 amostras microbianas foi isolado, com 114 bactérias e 3 fungos. A maioria dos canais continha uma ou duas espécies bacterianas (85% dos casos). As bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas predominaram, constituindo 69% das espécies isoladas. As espécies isoladas foram: *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces* spp., bacilos Gram-positivos anaeróbios, bacilos Gram-negativos facultativos, *Veillonella* spp., *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Candida* spp. *Enterococcus* foi o gênero bacteriano mais frequentemente isolado, presente em 47% dos canais com bactérias. Os autores concluíram que a microbiota dos dentes tratados endodonticamente diferenciava, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, dos dentes com polpas necrosadas e enfatizaram a necessidade de novas estratégias de combate à infecção desses dentes durante o retratamento não-cirúrgico.

Sundqvist *et al.* (1998) realizaram coletas microbiológicas de 54 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com lesões periapicais visíveis radiograficamente. A técnica do retratamento foi realizada sem o uso de solventes da guta-percha. O crescimento bacteriano foi detectado em 24 casos, sendo caracterizado por monoinfecções de microrganismos predominantemente Gram-positivos (87% das bactérias isoladas), com proporções aproximadamente iguais de bactérias anaeróbias facultativas (58%) e estritas (42%). Os gêneros isolados foram: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* e *Bacteroides*. *Candida* spp. foram detectadas em 2 casos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequente, isolada em 38% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias.

Cheung & Ho (2001) investigaram a microbiota de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais crônicas. Dezoito dentes previamente obturados com guta-percha foram analisados e 12 (66,7%) apresentaram crescimento bacteriano. Cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos foram os microrganismos mais frequentemente isolados,

especialmente os gêneros *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp. *Enterococcus* spp. não foram isolados neste estudo.

Pinheiro *et al.* (2003a) realizaram um estudo em 60 canais de dentes com insucesso endodôntico, destes, 51 canais apresentaram crescimento bacteriano. A microbiota era composta por bactérias anaeróbias facultativas (57,4%), predominantemente Gram-positivas (83,3%), sendo prevalente o gênero *Enterococcus* spp. 28 (46,7%). *Candida* spp. foram isoladas em 2 (3,3%) casos.

Pinheiro *et al.* (2003b) realizaram um estudo bacteriológico de 30 canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico e isolaram um total de 56 microrganismos, sendo 55 bactérias e 1 fungo dos 24 (80%) casos que apresentaram crescimento bacteriano. Os autores relataram que a microbiota era formada em sua maioria por monoinfecções (13/24 canais - 54%), composta por bactérias anaeróbias facultativas (58%), predominantemente Gram-positivas (80%), representadas pelos gêneros *Enterococcus* (36,7%) e *Streptococcus* (33,3%) e, em segundo plano, por bactérias anaeróbias estritas, em especial as do gênero *Peptostreptococcus* (23,3%). Foram ainda isoladas bactérias dos gêneros *Actinomyces* (13,3%), *Prevotella* (10%), *Staphylococcus* (10%), *Gemella* (10%), *Fusobacterium* (6,7%), *Veillonella* (6,7%), *Lactobacillus* (6,7%), *Propionibacterium* (3,3%) e *Haemophilus* (3,3%). *Candida* spp. foi isolada em 1 caso.

Gomes *et al.* (2004) realizando um estudo microbiológico de 60 canais radiculares de dentes com polpas necróticas (n = 41, infecção primária) e também com tratamento endodôntico prévio (n = 19, infecção secundária) associadas a lesões periapicais. A microbiota da infecção primária mostra um equilíbrio de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, sendo a maioria anaeróbias estritas, contendo mais de 3 espécies por canal radicular. Por outro lado, a infecção secundária apresenta mais bactérias Gram-positivas, anaeróbias facultativas, com cerca de 1-2 espécies por canal. Além disso, encontraram uma associação entre os casos de insucesso endodôntico e espécies do gênero *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*.

Enterococcus faecalis

Espécies de *Enterococcus* spp. pertenciam anteriormente ao gênero *Streptococcus*, classificadas como estreptococos do Grupo D de Lancefield. Trabalhos da década de 60 e 70 (Möller, 1966; Miranda, 1969; Nord & Wadsröm, 1973; Heintz *et al.*, 1975) referiam-se a espécies de *Streptococcus faecalis*, que atualmente são denominadas *Enterococcus faecalis* (Rosan, 1997).

Enterococcus faecalis freqüentemente isolados de canais radiculares com infecções endodônticas persistentes (Bender & Seltzer, 1952; Möller, 1966; Goldman & Pearson, 1969; Cavaleri *et al.*, 1989; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003a), representam uma proporção pequena da microbiota primária, ou seja, de dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais (Sundqvist *et al.*, 1992; Gomes, 1995; Sundqvist *et al.*, 1998; Gomes *et al.*, 1996a). Para um microrganismo colonizar canais com um tratamento endodôntico prévio, ele deve sobreviver aos procedimentos antimicrobianos realizados na terapia endodôntica inicial e suportar períodos de privações nutricionais no canal radicular obturado (Siqueira & Roças, 2004). Esses microrganismos têm capacidade de sobreviver em canais radiculares como microrganismos únicos sem a relação cooperativa de outras bactérias (Fabricius *et al.*, 1982; Sundqvist *et al.*, 1998).

Enterococcus faecalis são cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos e têm demonstrado resistência aos procedimentos endodônticos de desinfecção como o preparo químico-mecânico (Gomes *et al.*, 1996b; Sundqvist *et al.*, 1998).

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

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

período de preservação de 4 anos. Nos 24 dentes que apresentaram crescimento bacteriano, 19 casos eram caracterizados como monoinfecções, 4 apresentavam 2 microrganismos, e apenas 1 caso apresentava uma cultura polimicrobiana contendo 4 espécies bacterianas.

Love (2001) demonstrou que *Enterococcus faecalis* têm a capacidade de invadir os túbulos dentinários, podendo facilitar sua fuga aos procedimentos químico-mecânicos. Estes microrganismos também têm demonstrado resistência ao hidróxido de cálcio que é a medicação intracanal comumente utilizada para a desinfecção dos canais radiculares (Haapasalo & Orstavik, 1987). Além desses fatores, *Enterococcus faecalis* têm a capacidade de sobreviver em canais radiculares como microrganismos únicos sem a relação cooperativa de outras bactérias (Fabricius *et al.*, 1982, Sundqvist *et al.*, 1998).

Figor *et al.* (2003) demonstraram *in vitro* a capacidade do *Enterococcus faecalis* de suportar períodos prolongados de ausência de nutrientes em um estado metabólico mínimo. Os autores demonstraram a sobrevivência de um pequeno remanescente da população de *Enterococcus faecalis* na água (por 4 meses) e em meios com nutrientes limitados (por mais de 4 meses). Estas células bacterianas forma capazes de retornar ao crescimento após a adição de nutrientes. Todos esses fatores podem contribuir para a alta prevalência desses microrganismos em dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais (Siqueira & Roças, 2004).

Kaufman *et al.* (2005) estudaram 58 dentes e identificaram *E. faecalis* em casos de retratamento endodôntico com e sem lesão periapical. A prevalência do *E. faecalis* foi de 12%, sendo também isolados de dentes sem lesão periapical, mostrando que estas espécies não são responsáveis pela doença.

Tabela 1. Estudo cronológico da prevalência de *E. faecalis* e *Candida albicans* em dentes com insucesso do tratamento endodôntico com diferentes métodos de identificação microbiana e porcentagem de culturas positivas das amostras estudadas.

Estudos	Método de Identificação	Prevalência <i>E. faecalis</i>	Prevalência de <i>Candida albicans</i>	Porcentagem de amostras positivas
Engström, 1964	Cultura	5/21 (24%)	-	38%
Möller, 1966	Cultura	9/31 (29%)	3%	57%
Molander <i>et al.</i> , 1998	Cultura	23/68 (47%)	(4%)	68%
Sundqvist <i>et al.</i> , 1998	Cultura	9/24 (38%)	(8%)	44%
Peciulienė <i>et al.</i> , 2000	Cultura	14/20 (70%)	-	80%
Peciulienė <i>et al.</i> , 2001	Cultura	21/33 (64%)	6/40 (15%)	83%
Hancock <i>et al.</i> , 2001	Cultura	10/33 (30%)	3%	63%
Egan <i>et al.</i> , 2002	Cultura	-	4/25 (16%)	100%
Cheung & Ho, 2001	Cultura	0/12 (0%)	17%	66,7%
Rolph <i>et al.</i> , 2001	PCR	0/11 (0%)	0%	-
Pinheiro <i>et al.</i> , 2003 a	Cultura	27/51 (53%)	6,7%	85%
Pinheiro <i>et al.</i> , 2003 b	Cultura	11/24 (45,8%)	3,3%	80%
Siqueira & Roças, 2004	PCR	17/22 (77%)	2/22 (9%)	100%
Roças <i>et al.</i> , 2004	PCR	20/30 (67%)	-	100%
Fouad <i>et al.</i> , 2005	PCR	14/37 (22%)	-	100%
Kaufman <i>et al.</i> , 2005	PCR	7/58 (12%)	-	90%
Gomes <i>et al.</i> , 2006	Cultura	21/50 (42%)	-	100%
Gomes <i>et al.</i> , 2006	PCR	38/50 (76%)	-	100%
Este estudo, 2006	Cultura	8/30 (26,7%)	3%	100%

Staphylococcus spp.

Staphylococcus spp. estão associados aos abscessos dentais, abscessos associados com implantes osseointegrados e osteomielites, entre outros aspectos clínicos. Não são frequentemente isolados nos canais, podendo ser contaminantes externos (Myers *et al.*, 1969). Porém, Goldman & Pearson (1969) e Gomes *et al.* (1996b) relataram a persistência de espécies de *Staphylococcus spp.* após o saneamento dos canais e são também resistentes aos anti-sépticos e desinfetantes mais usados na endodontia.

Staphylococcus aureus foi isolado em 4 (13,3%) canais com tratamento endodôntico prévio. Reader *et al.* (1994) isolaram essa espécie bacteriana como único microrganismo associado a um caso de lesão periapical persistente ao tratamento endodôntico. Os autores discutiram a patogenicidade do *Staphylococcus aureus*, e relataram que embora essas espécies não sejam comumente isoladas dos canais radiculares, quando presentes, podem

permanecer viáveis por longos períodos devido à sua alta resistência a alterações provocadas no meio. Foi realizada a cultura microbiológica e teste de suscetibilidade antimicrobiana, que demonstrou resistência bacteriana a penicilina, amoxicilina e metronidazol, e sensibilidade a amoxicilina associada ao ácido clavulânico, que foi administrado para auxiliar o tratamento da infecção persistente. Os autores ressaltaram a importância desses testes para a seleção correta da antibioticoterapia.

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

Vigil *et al.* (1997) estudaram microrganismos de 28 lesões periapicais persistentes ao tratamento endodôntico. Os microrganismos mais comumente isolados foram: *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus intermedius*, “*Wolinella recta*”, *Fusobacterium* spp. e *Clostridium* spp.

Sunde *et al.* (2002) investigaram a microbiota de 36 dentes que não responderam bem ao tratamento endodôntico. Apenas um caso apresentou cultura negativa. Aproximadamente metade (51%) das cepas isoladas eram anaeróbias, sendo 79,5% Gram-positivas. Microrganismos facultativos dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, e *Candida* foram isolados de 27 (75%) lesões persistentes.

Propionibacterium e Actinomyces

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

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

Enterobactérias

Bacilos entéricos Gram-negativos, como *Pseudomonas aureginosa* (Ranta *et al.*, 1988) e fungos (Waltimo *et al.*, 1997) foram isolados em casos de infecções que não responderam adequadamente aos procedimentos químico-mecânicos durante o tratamento endodôntico convencional, geralmente com persistência de exsudato e dor à percussão.

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

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

tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram que *Enterococcus faecalis*, outras bactérias entéricas facultativas (*Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.) e *Pseudomonas* spp., foram encontradas mais freqüentemente em casos onde os canais radiculares não foram selados em algum momento do tratamento endodôntico, ou em casos com grande número de sessões. *Enterococcus faecalis* foram às espécies mais freqüentemente isoladas. Os autores enfatizaram a importância do controle da cadeia asséptica durante a terapia endodôntica no prognóstico do tratamento.

Ferrari *et al.* (2005) isolaram microrganismos de dentes com polpas necrosadas e 22% das espécies eram *Enterococcus* spp., enterobactérias e fungos. As coletas feitas após a instrumentação não apresentaram estes microrganismos, ao contrário das coletas pós-medicação intracanal que apresentaram novamente culturas de *Enterococcus* spp..

Davis *et al.* (2005) isolaram *Enterobacter cloacae* em dentes infectados que possuíam restaurações metálicas e no sequenciamento genético destas espécies encontraram o gene *silE*, responsável pela resistência à prata.

Fungos

Estudos têm demonstrado a presença de *Candida* spp. em aproximadamente 3% dos casos de canais com insucesso endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro, 2003a,b). A presença de fungos no canal radicular também pode ser resultado de contaminação durante o tratamento endodôntico (Waltimo *et al.*, 1997), e pode estar associada ao insucesso de dentes tratados endodonticamente (Nair *et al.*, 1990a; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998).

Os fungos têm demonstrado resistência a medicamentos comumente usados no processo de desinfecção endodôntica, o que pode explicar a sua presença em casos de canais com periodontites apicais persistentes (Waltimo *et al.*, 1999). Esses microrganismos, assim como as espécies de *Enterococcus faecalis*, parecem ter a habilidade de utilizar oportunidades criadas pela remoção de outros microrganismos, e também ter capacidade de viver em um meio pobre em nutriente, como o canal do dente tratado endodonticamente (Sundqvist *et al.*, 1998).

Waltimo *et al.* (1997), utilizando o meio TSBV (Tryptose-soy-agar enriquecido com bacitracina e vancomicina) para o isolamento primário de fungos e métodos de identificação específicos, isolaram fungos em 692 canais radiculares com infecções persistentes após o preparo químico-mecânico, sendo a *Candida* spp. 7% dos casos (48 amostras).

Baumgartner *et al.* (1999), utilizando o método de PCR (Polymerase chain reaction) detectaram *Candida albicans* em 5 de 24 (21%) canais radiculares infectados.

Infecção extracanal

A existência de uma rarefação óssea periapical, detectada anteriormente à instituição da terapia endodôntica, eleva consideravelmente o número de fracassos. Esse achado clínico encontra respaldo nos atuais conceitos microbiológicos, comprovando que as lesões periapicais sempre estão relacionadas com canais contaminados e, muitas vezes, os microrganismos não limitam sua colonização apenas à luz do conduto ou à profundidade dos túbulos dentinários, mas podem também encontrar abrigo na região periapical, infectando o cimento da superfície radicular (Cheung, 1996).

Em uma minoria dos casos, segundo Cheung (1996), o insucesso endodôntico pode estar relacionado a uma infecção extracanal. Estudos têm demonstrado a presença de bactérias na superfície externa radicular (Tronstad *et al.*, 1990; Molven *et al.*, 1991; Lomçah *et al.*, 1996; harn *et al.*, 1998) ou na lesão periapical (Sundqvist & Reuterving, 1980; Nair, 1987; Tronstad *et al.*, 1987; Sjögren *et al.*, 1988; Iwu *et al.*, 1990; Wayman *et al.*, 1992; Wasfy *et al.*, 1992; Abou-rass & Bogen, 1998).

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

Estudos têm reportado o isolamento de espécies de *Actinomyces israeli* (Sundqvist & Reuterving, 1980; Sjögren *et al.*, 1997), *Actinomyces* spp. (NAIR *et al.*, 1984) e “*Arachnia propionica*” (Sjögren *et al.*, 1988) de lesões periapicais resistentes ao tratamento

endodôntico, caracterizando uma actinomicose periapical. Fidgor *et al.* (1992), estudando a patogenicidade de espécies de *Actinomyces israeli* e “*Arachnia propionica*” em animais, observaram que uma cepa bacteriana isolada de uma lesão periapical pode formar colônias coesas, com grande número de células, escapando assim coletivamente da fagocitose que deveria ser realizada pelas células de defesa. A espécie “*Arachnia propionica*” foi incluída no gênero *Propionibacterium*, sendo atualmente denominada *Propionibacterium propionicum* (Sundqvist, 1994).

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

Tronstad *et al.* (1990) analisaram, através da microscopia eletrônica de varredura, a superfície dos ápices radiculares de 10 dentes com tratamento endodôntico prévio e lesões periapicais persistentes que foram submetidos à cirurgia periapical. Os autores verificaram que na região adjacente ao forame apical, nas irregularidades e reabsorções cementárias, havia uma placa bacteriana formada por uma variedade de formas (predominantemente cocos e bacilos), que eram mantidas juntas por um material extracelular.

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

Hasegawa-Nakano (1999) estudaram *in vitro* a capacidade de microrganismos isolados de canais radiculares infectados de formar o biofilme. Os autores selecionaram

para o estudo espécies de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureginosa* e *Candida albicans*, por serem bactérias de difícil eliminação durante a terapia endodôntica, e testaram a capacidade de aderência a um disco de colágeno colocado em um frasco contendo meio de cultura. O disco foi examinado através da microscopia eletrônica de varredura, e foi observada uma substância semelhante ao glicocálice em todos microrganismos isolados com exceção da *Candida albicans*. Os autores sugeriram que esses microrganismos tinham a capacidade de formar o biofilme devido à produção de substâncias semelhantes ao glicocálice.

PCR (Polimerase Chain Reaction)

A maioria dos estudos da microbiota de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais foram realizados através da coleta microbiológica dos canais radiculares e identificação bacteriana pelo método de cultura (Engström 1964; Möller 1966; Molander *et al.* 1998; Sundqvist *et al.* 1998; Pinheiro *et al.* 2003a,b; Gomes *et al.* 2004). Todos estes estudos apresentaram uma porcentagem de culturas negativas, refletindo a dificuldade da coleta microbiológica dos canais radiculares durante o retratamento endodôntico (Sundqvist *et al.*, 1998). Nestes casos, um número de células bacterianas pode ser perdido durante os procedimentos de remoção do material obturador. Conseqüentemente o número de células coletadas pode estar abaixo do nível de detecção do método da cultura e a prevalência dos microrganismos presentes nesses casos pode ser subestimada (Siqueira & Rôças, 2004). Para superar essas dificuldades inerentes ao método da cultura, pesquisadores têm utilizado métodos genéticos moleculares, em especial o PCR (Polimerase Chain Reaction), para identificar bactérias dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio (Rolph *et al.*, 2001; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças, 2004; Gomes *et al.*, 2006). Esses métodos se baseiam na detecção do DNA das espécies bacterianas sendo, portanto, mais sensíveis do que o método de cultura, além de poder identificar cepas de cultivo difícil (Siqueira, 2001).

Rolph *et al.* (2001) estudaram a microbiota de canais com polpas necrosadas e com tratamento endodôntico prévio utilizando métodos moleculares e cultura. Os autores relataram que houve um maior número de resultados positivos pelo método do PCR do que

pela cultura, especialmente em casos de retratamento. A análise molecular de 5 casos de infecções persistentes revelaram espécies dos gêneros *Capnocytophaga*, *Cytophaga*, *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Pepstreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus*, *Veillonella*. *Enterococcus* não foram isolados nos 5 casos estudados.

Siqueira & Rôças (2003) investigaram a presença de *Propionibacterium propionicum* e *Actinomyces radicidentis* em infecções endodônticas primárias e persistentes pelo método do PCR. *P. propionicum* estava presente em 36% das amostras de infecções primárias em 58% das amostras de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais. Por sua vez, *A. radicidentis* estava presente respectivamente, em 4% e 8% das infecções endodônticas primárias e persistentes. Os gêneros *Propionibacterium* e *Actinomyces* têm sido associados a lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico (Sundqvist & Reuterving, 1980, Nair *et al.*, 1984, Sjögren *et al.*, 1988, 1997).

Siqueira & Rôças (2004) investigaram a ocorrência de 19 espécies microbianas, pela análise do PCR, em 22 amostras de canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Todas as amostras foram positivas a pelo menos uma das seguintes bactérias Gram-positivas: *Enterococcus faecalis*, *Pseudoramibacter alactolyticus* ou *Propionibacterium propionicum*. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais prevalente, detectada em 77% dos casos. As outras espécies mais isoladas foram: *Pseudoramibacter alactolyticus* (52%), *Propionibacterium propionicum* (52%), *Dialister pneumosintes* (48 %) e *Filifactor alocis* (48%). *Candida albicans* foi isolada em 9% das amostras.

Utilizando o PCR, Rôças *et al.* (2004) investigaram a prevalência de *Enterococcus faecalis* em canais não tratados e em canais com tratamento endodôntico prévio associado a lesões periapicais crônicas. *Enterococcus faecalis* foi isolado em 67% (20/30) dos dentes com insucesso do tratamento endodôntico e em 18 % (9/50) dos casos de infecções primárias, sendo isolados principalmente em dentes assintomáticos.

Gomes *et al.* (2006) investigaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em canais com polpas necrosadas e em canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico, utilizando a cultura e o PCR. Nos 50 casos de insucesso endodôntico, *E. faecalis* estava presente em 21 (42%) casos pela cultura, e em 38 (76%) casos pela análise do PCR das

mesmas amostras. Por outro lado nos 50 casos de infecções primárias, *E. faecalis* estava presente em 2 (4%) e 41 (82%) canais, respectivamente, pela cultura e PCR. Esses resultados mostraram que *Enterococcus faecalis* pode estar presente em canais com polpas necrosadas, porém em quantidades bem pequenas, não detectáveis pelo método de cultura. Segundo os autores, o crescimento dessa espécie bacteriana pode ser favorecido por mudanças ecológicas no canal radicular após o preparo químico-mecânico ou obturação deficiente do canal radicular, tornando possível sua detecção nas culturas microbiológicas de dentes com insucesso do tratamento endodôntico.

Infiltração coronária

O insucesso do tratamento endodôntico também tem sido relacionado à ausência de um selamento coronário adequado após o tratamento endodôntico (Swatz *et al.*, 1983; Ray & Trope, 1995; Heling *et al.*, 2002). Trabalhos demonstram que bactérias e seus produtos podem penetrar nas falhas marginais de uma restauração defeituosa e na interface entre o material obturador e o canal radicular, e atingir a região periapical (Torabinejad *et al.*, 1990; Magura *et al.*, 1991; Cheung, 1996).

O conceito da infiltração coronária como umas das causas do insucesso da terapia endodôntica foi descrito por Marshall & Massler (1961), que estudaram o papel do selamento coronário em dentes tratados endodônticamente demonstrando que a infiltração ocorria a despeito da presença da restauração coronária.

Segundo Wilcox & Diaz-Arnold (1989) a microinfiltração coronária ao redor das restaurações tem o potencial de dissolver o cimento obturador, comprometendo o prognóstico do tratamento endodôntico.

Analisando o efeito da infiltração coronária em dentes tratados endodônticamente expostos à saliva, Magura *et al.* (1991) observaram contaminação através da infiltração de corantes e da análise histológica e verificaram que após 90 dias, a infiltração foi significativamente maior do que os outros períodos estudados (2, 7, 14 e 28 dias). Os autores sugeriram a realização do retratamento endodôntico em dentes sem restaurações coronárias e expostas ao meio bucal por três meses ou mais. Em casos onde o canal tiver preparo para

pino com menor quantidade de material obturador, este período deveria ser reduzido na indicação do retratamento.

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

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

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

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

Hommez *et al.* (2002) avaliaram o impacto da restauração coronária com bases clínicas e radiográficas e a qualidade das obturações na resposta periapical. Foram radiografados 745 dentes e as características clínicas e radiográficas da coroa foram

avaliadas quando a infiltração marginal e cárie. A obturação foi avaliada quanto ao comprimento e homogeneidade e o periápice quanto à presença ou ausência de lesão apical. A relação entre o estado coronário, qualidade da obturação e a resposta periapical foi determinada. Os resultados apresentaram 33% dos dentes com presença de lesões periapicais. Dentes com restaurações coronárias consideradas clinicamente boa ou ruim apresentavam lesões periapicais em 31,1% e 36,8%, respectivamente; esta diferença não foi estatisticamente significativa. Todavia, a qualidade das restaurações coronárias avaliadas radiograficamente influenciou nas condições periapicais tendo significância estatística ($p < 0,001$) e apresentando lesão em 23,8% e 49,1%, respectivamente para restaurações satisfatórias e insatisfatórias. Assim, concluíram que um bom tratamento endodôntico e uma boa restauração influenciam no sucesso do tratamento endodôntico.

Adib *et al.* (2004) estudaram a microbiota de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais persistentes e infiltração coronária. Oito dentes extraídos foram seccionados transversalmente em 3 partes: a coroa e dois segmentos da raiz (coronário e apical), que foram coletados individualmente. Microrganismos foram isolados de todos os casos com um total de 252 cepas isoladas. A grande quantidade de microrganismos isolados nos canais radiculares se deve, segundo os autores, ao fato de todas as amostras apresentarem infiltrações coronárias e, também, à sensibilidade da técnica de coleta e cultura utilizadas. O maior número de cepas foi encontrado em casos com infiltração coronária e obturações endodônticas de má qualidade. A porção coronária apresentava uma diversidade bacteriana maior ou igual à porção apical na maioria dos canais radiculares. Houve um predomínio de bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas, incluindo os gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*. Esses autores recomendam o selamento coronário definitivo como parte integrante do tratamento endodôntico para a obtenção do sucesso endodôntico.

Microbiota da saliva / Ecossistema bucal

Desde o nascimento o homem está cercado por um número incontável de microrganismos. Muitos deles (cerca de 100 trilhões), na verdade, estabeleceram uma morada na superfície de nossa pele, de nossos dentes e da mucosa que tem contato com o

meio externo. Assim, vários dos nossos compartimentos orgânicos abrigam uma série de microrganismos que infectam esses locais mesmo no estado de saúde, constituindo as microbiotas próprias de cada local. Cada região do organismo é considerada um habitat diferente, pois oferece diferentes condições ambientais, motivo da não existência de uma microbiota única, igual em todas as regiões. Existem diferentes composições teciduais, portanto, diferentes receptores para a aderência e diferentes nutrientes necessários para cada microrganismos, diferentes teores de umidade, diferentes pH, maior ou menor teor de oxigênio, entre outros fatores. É evidente que só colonizam uma certa região, um certo habitat, os microrganismos que se adaptam à sua condição ecológica. A cavidade bucal, em função da sua complexidade anatômica, apresenta vários sítios ecológicos, sendo a mais complexa de todo o corpo humano: só de bactérias existem mais de 30 gêneros diferentes, abrangendo mais de 500 espécies diferentes (De Lorenzo, 2004).

Socransky & Haffajee (2002) relataram que, na boca, existem aproximadamente 350 espécies bacterianas já cultivadas e mais de 200 que foram reconhecidas por métodos genéticos. Em número total de microrganismos, a microbiota bucal só pode ser comparada com a microbiota intestinal, mas a bucal é bem mais complexa devido à existência de dentes.

O uso de substâncias antimicrobianas, embora eventual, pode desequilibrar a microbiota bucal. A utilização de antibióticos de amplo espectro de ação durante algum tempo, suprime a grande maioria das bactérias, mas ao mesmo tempo favorece o superdesenvolvimento de espécies resistentes e de fungos como *Candida albicans*. A microbiota bucal pode sofrer algumas modificações em função de alterações sistêmicas fisiológicas e patológicas como: alterações hormonais, estresse, diabetes, leucemia, imunodeficiências e quimioterapias anti-câncer (De Lorenzo, 2004).

Em 1964, Engström postulou que havia uma correlação direta entre a ocorrência de *Enterococcus* spp. na cavidade oral e na câmara pulpar. Egan *et al.* (2002) relacionaram a prevalência e a diversidade dos fungos nas amostras de saliva e canal radicular dos mesmos pacientes, associando também os fatores clínicos. Fungos não foram frequentemente encontrados, estando presentes em 6/60 canais radiculares (10%). Dos casos positivos, 2 eram dentes infectados e não tratados (de um total de 35), enquanto 4 eram casos de dentes

tratados endodonticamente associados a lesões periapicais (de um total de 25). Concluíram que a presença de fungos no canal radicular está associada à sua presença na saliva, independentemente da restauração coronária ou tratamento endodôntico prévio.

Sedgley *et al.* (2005) estudaram a prevalência de enterococci oral pelo método PCR. *Enterococcus faecalis* foram detectados em 11% de 100 pacientes que estavam em tratamento endodôntico e em 1% de 100 estudantes que não possuíram nenhum tratamento endodôntico. As cepas de *E. faecalis* apresentaram alguns fatores de virulência como produção de hemólise, gelatinase e bacteriocina. Além disso, todas foram suscetíveis a ampicilina, benzilpenicilina, gentamicina e vancomicina.

Sedgley *et al.* (2006) investigaram pelo método de cultura e PCR a presença de *E. faecalis* em diversos sítios da cavidade oral de 41 pacientes (n=136) em terapia endodôntica. A prevalência foi de 68% dos pacientes, sendo apenas 5% detectados nos canais radiculares. *E. faecalis* foram mais detectados na língua do que no sulco gengival, fluido salivar e canal radicular. O método de identificação por PCR foi mais eficaz do que o método de cultura para detecção de *E. faecalis* da cavidade oral.

Outros fatores associados ao insucesso endodôntico

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

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

Lin *et al.* (1991) relataram que tecidos necróticos e materiais obturadores nocivos poderiam agir como irritantes, causando uma inflamação periapical. Os autores também

encontraram casos diagnosticados como cistos apicais, que foram considerados fatores de insucesso.

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

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

Tratamento do insucesso endodôntico

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

Como a maioria dos fracassos endodônticos resulta de uma proliferação bacteriana dentro do canal do dente com tratamento endodôntico prévio, a razão para se realizar o retratamento convencional, isto é, a desinfecção do sistema de canais radiculares, obedece tanto aos princípios biológicos quanto aos princípios técnicos que regem a terapia endodôntica (Hepworth & Friedman, 1997). Assim, o retratamento endodôntico é, de acordo com a maioria dos autores, o tratamento de primeira escolha, porém a cirurgia periapical consiste em um tratamento adicional nos casos em que o retratamento fracassou

ou não foi possível de ser realizado (Friedman & Stabholtz, 1986; Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997, Ruddle, 1997).

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

É importante ressaltar que a realização do retratamento convencional, antes da cirurgia periapical, aumenta o índice de sucesso da mesma (Hepworth & Friedman, 1997; Briggs & Scott, 1997).

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

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

O uso de antibióticos sistêmicos como complemento à terapêutica de casos de insucessos endodônticos

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

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

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

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

Debelian *et al.* (1995), com o objetivo de estudar a bacteremia associada ao tratamento endodôntico, realizaram coletas microbiológicas de 26 canais radiculares associados a periodontites apicais crônicas antes da instrumentação, e coletas sanguíneas durante e 10 minutos após a instrumentação endodôntica. Microrganismos anaeróbios foram isolados de todos os canais radiculares e de 11 coletas sanguíneas. As espécies microbianas isoladas da corrente sanguínea foram: *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Actinomyces israelii*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus sanguis*. Testes bioquímicos e antibiogramas revelaram que os isolados dos canais radiculares e do sangue tinham o mesmo padrão. Os resultados demonstraram que os microrganismos encontrados no sangue tinham como fonte o canal radicular.

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

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

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

Para Dajani *et al.* (1997) a endocardite infecciosa causada por *Streptococcus* do grupo viridans é mais comum após certas intervenções odontológicas do trato respiratório superior e do esôfago, não sendo comum que esses microrganismos causem complicações em procedimentos invasivos do trato gastro-intestinal e genito-urinário. Similarmente, segundo os autores, a endocardite provocada por *Enterococcus* spp. seria uma conseqüência de intervenções do trato gastro-intestinal, e não uma conseqüência comum dos procedimentos odontológicos. Para o uso correto da profilaxia antibiótica, um dos princípios básicos é o conhecimento dos principais microrganismos causadores da infecção e sua suscetibilidade antimicrobiana (Grad, 1997).

Streptococcus do grupo viridans são α - hemolíticos pertencem às espécies dos grupos dos *S. sanguis*, *S. milleri*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *S. salivarius*, *S. vestibularis* e “*Gemella* spp” (Gomes, 1995).

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

Bactérias anaeróbias são consideradas causas incomuns, porém importantes, da endocardite infecciosa (Nord, 1982). Entretanto, estudos têm demonstrado um aumento na incidência de bacteremia por bactérias anaeróbias após procedimentos dentais (Debelian *et al.* 1992, 1995; Sapico & Sarma, 1983; Sapico & Aldridge, 1993). Segundo Debelian *et al.* (1994), isso se deve à melhoria das técnicas microbiológicas.

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

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

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

Cefalexina ou cefadroxil são cefalosporinas e estão indicadas pelo protocolo da *American Heart Association* como uma droga alternativa para pacientes alérgicos às penicilinas, desde que os mesmos não apresentem história de reações alérgicas imediatas às penicilinas (urticária, angioedema e anafilaxia) (Dajani *et al.*, 1997). Segundo Grad (1997), devido à possibilidade dos pacientes alérgicos às penicilinas apresentarem sensibilidade cruzada e desenvolverem reações alérgicas às cefalosporinas e devido à existência de outras opções de profilaxia antibiótica, sugere que, em pacientes alérgicos às penicilinas, às

cefalosporinas só devem ser consideradas se o paciente não poder tomar clindamicina, azitromicina ou claritromicina.

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

Antibióticos: mecanismo de ação e resistência

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

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

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

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

Penicilinas

As penicilinas, como um grupo, são os agentes antimicrobianos mais frequentemente utilizados, e constituem a primeira opção como coadjuvante no tratamento das infecções odontológicas leves ou moderadamente severas, e na prevenção da endocardite bacteriana

(Greenberg *et al.*, 1979; Moenning *et al.*, 1989; Abbott *et al.*, 1990; Baker & Fotos, 1994; Sands *et al.*, 1995; Andrade, 1999).

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

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

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

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

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

Staphylococcus são as bactérias Gram-positivas que mais comumente produzem beta-lactamases, inativando as penicilinas (Forbes *et al.*, 1998). Várias alterações na estrutura dos agentes beta-lactâmicos têm sido desenvolvidas para proteger o anel beta-lactâmico contra a hidrólise enzimática, aumentando a eficácia do antibiótico nos microrganismos produtores de beta-lactamases. As isoxazolil-penicilinas, que compreendem a oxacilina e dicloxacilina, são antibióticos de pequeno espectro, resistentes às beta-lactamases, indicados quase exclusivamente em infecções estafilocócicas (Walker, 1992; Forbes *et al.*, 1998; Andrade, 1999). Como os *Staphylococcus* não constituem os patógenos primários das

infecções odontogênicas, essa droga não está indicada na maioria dos casos (Moenning *et al.*, 1989).

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

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

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

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

Segundo Forbes *et al.* (1998) outro mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas aos antibióticos beta-lactâmicos é a diminuição de absorção da droga pela célula bacteriana. Esse mecanismo não é possível nas bactérias Gram-positivas, pois o antibiótico alcança diretamente as enzimas para impedir a síntese da parede celular. As bactérias Gram-

negativas, porém, possuem uma membrana externa que cobre a parede celular, pela qual o antibiótico vai ter que passar para atingir o seu alvo. Mudanças no número e características dos poros da membrana externa podem reduzir a entrada do antibiótico e contribuir para a resistência. Esse mecanismo, associado à presença de beta-lactamases no espaço periplasmático, podem resultar em níveis clinicamente relevantes de resistência das bactérias Gram-negativas.

A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos também pode ser adquirida quando as bactérias alteram o alvo onde antibiótico vai agir. Nesse mecanismo, o microrganismo muda, ou adquire de outro microrganismo, os genes que codificam as enzimas responsáveis pela síntese da parede celular. Essas novas enzimas, derivadas de mutações genéticas, continuam sua função mesmo na presença do antibiótico beta-lactâmico, geralmente porque esses não apresentam afinidade suficiente por essas enzimas. Esse é o mecanismo pelo qual espécies de *Staphylococcus* podem apresentar resistência às penicilinas (ao grupo das penicilinas resistentes às beta-lactamases) e a outros agentes beta-lactâmicos. Esse mecanismo também é responsável pela resistência aos beta-lactâmicos observadas entre espécies de *Enterococcus* e algumas espécies de *Streptococcus pneumoniae* e estreptococos *viridans* (Forbes *et al.*, 1998).

Segundo o Conselho de Assuntos Científicos da ADA (*American Dental Association*), em sua reunião em 1997, a resistência aos antibióticos tem aumentado em uma taxa alarmante. A resistência à penicilina de *Streptococcus pneumoniae* tem crescido de praticamente zero, há poucos anos atrás, a 25% a 60% de todas espécies isoladas. Essa resistência à penicilina tem aumentado também entre espécies de estreptococos *viridans*.

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

Baker *et al.* (1985) isolaram *Streptococcus mutans* resistentes às penicilinas da cavidade oral. Quayle *et al.* (1987) também encontraram resistência às penicilinas em espécies de estreptococos *viridans*, entre organismos isolados de infecções odontogênicas.

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

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

Lincosaminas

A clindamicina é a única droga do grupo das lincosaminas que possui indicação na odontologia e constitui um dos antibióticos mais eficazes contra infecções odontogênicas sérias (Moening *et al.*, 1989; Baker & Fotos, 1994; Grad 1997; Andrade, 1999).

Essa droga é ativa contra a maioria das bactérias Gram-positivas, abrangendo espécies anaeróbias e facultativas, inclusive *Staphylococcus aureus* e outras espécies produtoras de beta-lactamases. A clindamicina é particularmente ativa contra quase todos anaeróbios Gram-negativos, incluindo *Bacteroides fragilis* (Walker, 1992; Moennig *et al.*, 1989; Sands *et al.*, 1995; Andrade 1999). As bactérias Gram-negativas aeróbias não são sensíveis à clindamicina (Walker, 1992; Chambers & Sand, 1995).

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

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

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

Cullmann *et al.* (1993) investigando a suscetibilidade antimicrobiana de diversas bactérias anaeróbias a diferentes agentes, relataram que, dentre os antibióticos não beta-lactâmicos, a clindamicina foi o composto mais ativo. Essa droga também se mostrou eficaz contra os *Bacteroides* spp., que foram consideradas no estudo, as espécies mais resistentes aos agentes antibacterianos.

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

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

Walker (1992) e Chambers & Sand (1995) relatam que microrganismos resistentes a clindamicina frequentemente apresentam resistência-cruzada com os macrolídeos. Entretanto as espécies resistentes a eritromicina não são necessariamente resistentes à clindamicina.

Macrolídeos

Os macrolídeos são um grupo de antibióticos que possuem em comum, na sua estrutura química um anel lactônico de 15 átomos. Este grupo inclui a eritromicina e outras drogas relacionadas quimicamente com a eritromicina, como a claritromicina e roxitromicina (Andrade, 1999). A azitromicina difere dessas drogas pela a inserção de apenas um átomo de nitrogênio no anel lactônico de 15 átomos, o que parece conferir a essa droga mudanças em algumas características farmacocinéticas, como uma meia-vida plasmática biológica bastante prolongada nos tecidos, e um maior espectro de ação (Chambers & Sand, 1995; Andrade, 1999).

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

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

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

Baker *et al.* (1993) isolaram 139 amostras bacterianas da cavidade oral, anaeróbias estritas e facultativas, e testaram a suscetibilidade bacteriana a diversos antibióticos. Os resultados demonstraram que praticamente todos os grupos bacterianos continham espécies resistentes a eritromicina, compreendendo espécies de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides oralis*, *Campylobacter* spp., *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*.

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

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

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

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

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

Peters *et al.* (1992), em uma revisão da literatura sobre a atividade antimicrobiana da azitromicina e de outros macrolídeos, relataram que embora a azitromicina apresentasse menor atividade do que a eritromicina *in vitro* contra os microrganismos Gram-positivos, clinicamente, as concentrações da azitromicina nos tecidos eram superiores a da eritromicina. Após a administração oral, as concentrações sanguíneas da azitromicina são menores que a eritromicina, porém isso reflete a rápida movimentação da droga da circulação para os compartimentos intracelulares, resultando em uma maior concentração tissular do que a comumente vista com a eritromicina. Entretanto, a desvantagem potencial da baixa concentração sanguínea da azitromicina está relacionada a bacteremia que pode

ocorrer em pacientes que estão comprometidos severamente. Contudo, a concentração tissular é mais importante que a sérica para o tratamento de doenças do trato respiratório e outras infecções (Peters *et al.*, 1992).

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

Testes de suscetibilidade antimicrobiana

Muitas bactérias, clinicamente importantes, são capazes de adquirir e expressar resistência a agentes antimicrobianos comumente usados para tratar infecções, o que torna necessário, em determinadas situações, a realização de testes laboratoriais para detectar a resistência ou suscetibilidade antimicrobiana desses microrganismos (Finegold *et al.*, 1988; Cullman *et al.*, 1993; van Steenberg *et al.*, 1993; Rosenblatt & Brook, 1993; Wexler 1993; Barnard *et al.*, 1996; Forbes *et al.*, 1998).

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

Testes de suscetibilidade geralmente consistem na avaliação da atividade direta do agente antimicrobiano sobre a bactéria, que são colocados juntos em um mesmo meio *in vitro* para verificar a viabilidade da bactéria na presença de um determinado medicamento em uma determinada concentração (Forbes *et al.*, 1998). Os métodos mais utilizados são os testes de suscetibilidade convencionais como a diluição em caldo (Barnard *et al.*, 1996), a diluição em ágar (Baker *et al.*, 1984; Yamamoto *et al.*, 1989; Abu-fanas *et al.*, 1991) e o método da difusão de discos em ágar (Zeldore *et al.*, 1962); e os testes de suscetibilidade

comerciais, que são variações dos métodos convencionais de diluição (Cullman *et al.*, 1993) e difusão (Citron *et al.*, 1991; Ngui-Yen *et al.*, 1992; Olsson-Lijequest, 1992; Brown, 1992; Bolmström, 1993; Conti, 1997; Le Goff *et al.*, 1997; Vigil *et al.*, 1997).

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

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

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

E-test

Um teste de suscetibilidade comercial, que representa uma variação do método de difusão em ágar, o E-test, foi desenvolvido combinando a conveniência e praticidade do método do disco com a habilidade de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) (Bolmström, 1993).

O E-test consiste em uma fita plástica de 50mm de comprimento e 3mm de largura, que contém em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma

escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita é colocada sobre uma placa de ágar, previamente inoculada com a bactéria a ser estudada, propiciando a difusão de um gradiente de antibiótico. Após o período de incubação, uma zona elíptica de inibição é formada; o ponto de interseção da borda da zona de inibição com a escala numérica da fita, referente à concentração da droga representam a CIM. A fita do E-test pode detectar uma CIM que varia de 0,016 a 256 µg/ml, com um total de 29 diferentes CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström, 1993).

O E-test constitui um método simples de realizar e fácil de interpretar para se testar a suscetibilidade antimicrobiana (Citron *et al.*, 1991; Ngui-Yen *et al.*, 1992; Olsson-Liljequest, 1992; Brown, 1992; Bolmström, 1993; Conti 1997; Le Goff *et al.*, 1997; Vigil *et al.*, 1997). Para a maioria das combinações antibiótico-bactéria, a elipse formada é clara, com a CIM bem definida (Citron *et al.*, 1991; Bolmström, 1993).

O E-test é considerado um método eficaz para a determinação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (Olsson-Liljequist, 1992; Brown, 1992; Ngui-Yen *et al.*, 1992). Seu uso também é indicado para testar suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas (Citron *et al.*, 1991; Nachnanini *et al.*, 1992; Bolsmtröm, 1993; Conti, 1997).

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

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

Suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções endodônticas

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

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

Zeldore & Ingle (1962), estudando a sensibilidade antimicrobiana de bactérias facultativas isoladas do canal radicular, testaram a suscetibilidade, através do método do disco, de espécies de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Enterococcus*, utilizando os seguintes antibióticos: penicilina, eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol. Os resultados demonstraram que 32,4% dos *Staphylococcus* eram resistentes à penicilina e 24,3% à

tetraciclina. Em geral, os *Streptococcus* foram sensíveis aos antibióticos estudados, enquanto os *Enterococcus* foram resistentes à penicilina em 83% dos casos e a tetraciclina em 33%. Todos microrganismos estudados foram sensíveis à eritromicina e ao cloranfenicol.

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

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

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

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

Ernest *et al.* (1977) testaram o grau de sensibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas e facultativas isoladas dos canais radiculares de 55 dentes com polpas necrosadas. As bactérias anaeróbias estritas isoladas continham espécies pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* e *Fusobacterium*, e foram testadas quanto à suscetibilidade através de um método de diluição em caldo. As bactérias anaeróbias facultativas compreendiam espécies de *Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* e o teste utilizado foi o método do disco. Os autores demonstraram que, para as bactérias anaeróbias estritas estudadas, a clindamicina foi a droga mais eficaz, mostrando-se ativa em 100% dos casos. A ampicilina e a penicilina G foram eficazes em 85% e 83%, respectivamente. A eritromicina foi a droga menos eficaz contra as bactérias anaeróbias estritas, apresentando-se eficaz em apenas 58% dos casos. As bactérias anaeróbias facultativas testadas apresentaram alta incidência de resistência: 58% das espécies facultativas eram resistentes à penicilina G e 81% à clindamicina. A ampicilina e a eritromicina foram eficazes, respectivamente, em 71% e 61% das bactérias facultativas estudadas. Os autores concluíram que a ampicilina era uma droga eficaz para o tratamento de infecções endodônticas, constituindo a droga de escolha. Entretanto, segundo os autores, se os resultados bacteriológicos indicassem uma infecção puramente anaeróbia, a droga preferida seria a clindamicina.

Hunt *et al.* (1978) analisaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de exsudatos de infecções odontogênicas agudas em 74 pacientes atendidos na Universidade de Emory, EUA, no período entre 1973 e 1976. Espécies de "*Streptococcus viridans*", *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Peptostreptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* e "*Bacteroides*" foram testadas através do método do disco,

utilizando ampicilina, cefalotina, eritromicina e penicilina. Todas as espécies de *Streptococcus* isoladas foram suscetíveis à ampicilina, cefalotina e penicilina. Entretanto, aproximadamente 50% das espécies de “*Streptococcus viridans*” foram resistentes a eritromicina. Dentre as espécies de *Staphylococcus aureus* isoladas, 20% foram resistentes à ampicilina e à penicilina, e cerca de 50% foram resistentes à eritromicina.

Matusow (1981) analisou a suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos isolados de 78 canais radiculares de dentes com abscessos dento-alveolares agudos. Do total de 105 microrganismos isolados, 82 eram aeróbios e anaeróbios facultativos, cuja sensibilidade antimicrobiana foi testada através do método do disco. Dentre essas bactérias, somando-se as espécies sensíveis e de sensibilidade intermediária aos antibióticos testados, 73 espécies se apresentaram suscetíveis à eritromicina; 72 à ampicilina; 67 à penicilina e 59 à clindamicina. A suscetibilidade das 23 bactérias anaeróbias isoladas também foi estudada através do método do disco, embora, segundo o autor, esse método seja padronizado apenas para bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas. A clindamicina e a ampicilina foram efetivas contra todas as 23 espécies bacterianas aneróbias estritas estudadas, seguidas da penicilina, que demonstrou eficácia contra 22 espécies. A eritromicina apresentou eficácia moderada, sendo ativa contra 19 espécies. No presente estudo, o gênero *Streptococcus* foi o mais predominante, e o *Enterococcus* o mais resistente. Dentre as espécies de *Enterococcus*, 59,7% foram resistentes a clindamicina, 21,5% resistentes a penicilina e a ampicilina, enquanto nenhuma resistência foi apresentada com a eritromicina.

Com o objetivo de estudar a evolução da microbiologia das infecções orais e sua suscetibilidade antimicrobiana, Hunt & Meyer (1983) estudaram 235 pacientes com infecções odontogênicas agudas, entre 1978 e 1981. Os autores encontraram, em contraste com seu estudo em 1978, que aproximadamente 15% das espécies de *Streptococcus viridans* isoladas se tornaram resistentes as penicilinas. Segundo os autores, talvez o fato de maior importância, foi o aparecimento de espécies de *Peptostreptococcus* (cerca de 15%) resistentes a ampicilina e a penicilina.

Yamamoto *et al.* (1989) testaram a suscetibilidade antimicrobiana do *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e *Bacteroides*, isolados de canais radiculares de dentes com inflamações apicais agudas. Os resultados dos testes, utilizando o método da diluição em

ágar, demonstraram que *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* e “*Bacteroides* pigmentados de negro” foram sensíveis à benzilpenicilina e amoxicilina. Os três grupos apresentaram certa resistência à eritromicina. Os *Bacteroides* não pigmentados se apresentaram mais resistentes quando comparados com os pigmentados, apresentando suscetibilidade intermediária à penicilina e presença de muitas espécies resistentes à eritromicina. Os autores concluíram que as drogas do grupo das penicilinas foram mais efetivas contra as bactérias estudadas, o que as tornam as drogas de escolha para o tratamento de canais radiculares com periodontites apicais agudas.

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

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

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

Pinheiro *et al.* (2004) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de 21 cepas de *E. faecalis* isolados de canais com insucesso endodôntico com lesão periapical persistente. Todas as amostras foram suscetíveis às penicilinas “*in vitro*”, mas a concentração inibitória mínima (CIM) da amoxicilina e amoxicilina com ácido clavulânico (CIM₉₀ = 0,75 µg/mL⁻¹) foi menor que a benzilpenicilina (CIM₉₀ = 3,0 µg/mL⁻¹). Todas as cepas foram também suscetíveis à vancomicina e moxifloxacina, sendo que 95,2% das cepas foram suscetíveis ao cloranfenicol. Entre os isolados 85,7% eram suscetíveis à tetraciclina e doxiciclina e 80,9% à ciprofloxacina. A CIM da eritromicina variou de 0,38 para >256 µg/mL⁻¹, apenas 28,5% das amostras foram suscetíveis (CIM ≤ 0,5 µg/mL⁻¹). A azitromicina apresentou suscetibilidade baixa (14,2%). Concluíram que *E. faecalis* foram totalmente suscetíveis “*in vitro*” à amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, vancomicina e moxifloxacina. A maioria das cepas foram também suscetíveis ao cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina e ciprofloxacina. Eritromicina e azitromicina foram às menos efetivas.

Reynaud *et al.* (2006) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de 59 cepas de *E. faecalis* isolados de canais infectados de pacientes da Finlândia e Lituânia. Foi encontrada uma alta prevalência de resistência à rifampicina, como também à penicilina e ampicilina. Entretanto, vancomicina e gentamicina não apresentaram resistência. Concluíram que mesmo havendo diferença nos antibióticos de escolha nos dois países, as cepas de *E. faecalis* mantiveram padrões de suscetibilidade semelhantes.

3. PROPOSIÇÃO

- Identificar pelo método de cultura *Enterococcus* spp., *Candida* spp., *Staphylococcus* spp. e enterobactérias na saliva de pacientes que possuíam dentes com insucesso endodôntico associados a lesões periapicais.
- Identificar pelo método de cultura os microrganismos da face interna do material restaurador e dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico com lesões periapicais.
- Relacionar os achados clínicos e radiográficos com a presença de microrganismos específicos nos canais radiculares.
- Analisar a sensibilidade antimicrobiana de espécies de *Enterococcus faecalis* isolados dos dentes com insucesso endodôntico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionados 30 pacientes adultos que apresentavam dentes restaurados e com insucesso do tratamento endodôntico, devido à presença de lesão periapical visível radiograficamente, seguindo os seguintes critérios:

- ❖ Tratamento endodôntico prévio com no mínimo 4 anos (dentes assintomáticos) e/ou presença de sinais e sintomas associados ao dente (e.g. dor à percussão).
- ❖ Ausência de fratura radicular.
- ❖ Ausência de história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos (mínimo de 6 meses).
- ❖ Ausência de doenças sistêmicas e doença periodontal.

Primeiramente foi realizada uma anamnese. Para cada paciente foram anotados: dados pessoais, história médica e história dentária (incluindo o tempo que foi realizado o tratamento endodôntico) condições clínicas do dente tratado endodonticamente, tais como, qualidade das restaurações, presença de coroas metálicas, cáries, fraturas; presença de fístula e edema. Foram realizados testes para verificar a dor à percussão, à palpação e a mobilidade dental, além da realização de sondagem periodontal.

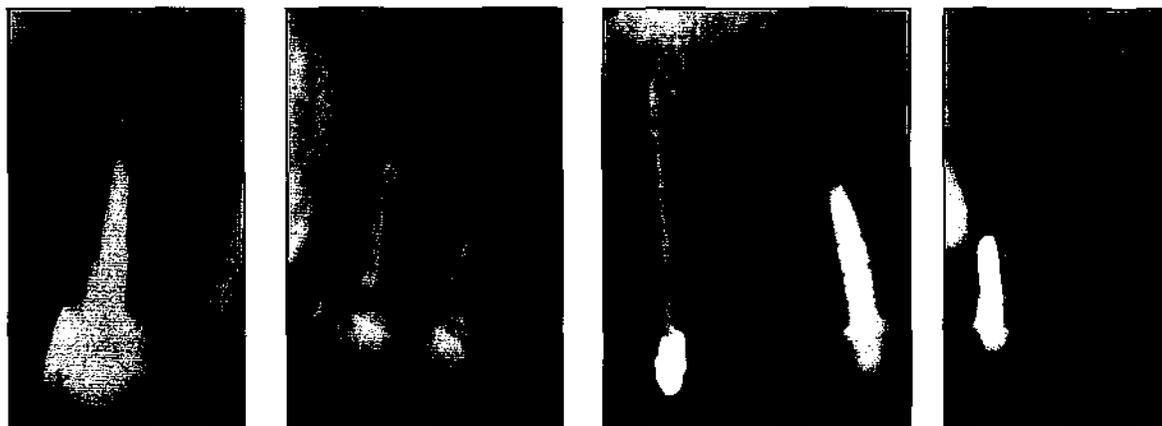


Figura 1. Exemplos de casos clínicos selecionados para este estudo.

Na análise radiográfica (Fig.1), foram avaliados os seguintes aspectos:

- presença de imagem radiográfica sugerindo infiltrações nas restaurações;
- limite da obturação dos canais radiculares, que foram divididos em intervalos de 0-2 mm, 3-5 mm, > 5 mm do ápice e sobre-obturados;
- qualidade do tratamento endodôntico: considerado bom quando a guta-percha estava bem condensada e radiograficamente não se observava áreas radiolúcidas na obturação ou entre o material obturador e a parede do canal, com limite da obturação entre 0-2 mm do ápice e sem espaço vazio entre o pino e a obturação. Considerado em ruim quando: havia a presença de falhas radiolúcidas na obturação, indicando um selamento deficiente ou espaços vazios entre o pino e a obturação ou com limite da obturação maior que 2 mm do ápice radiográfico.
- presença de pino intraradicular;
- espaço entre o pino e o material obturador medido em mm;

Logo após a anamnese, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (Anexo D). Sisnep: 0008.0.167.000-05

4.1. Coleta das amostras

Foram realizadas as coletas microbiológicas da saliva, da coroa e do canal radicular durante o retratamento endodôntico, ou seja, na mesma sessão odontológica. O paciente, logo no início do atendimento, recebia um frasco plástico estéril para dispensar o fluido salivar acumulado naquele momento. Em seguida, iniciavam-se os procedimentos clínicos para as coletas da face interna das restaurações ou pino-intraradicular e da guta-percha removida dos canais durante a desobturação.

O método utilizado neste estudo já foi descrito previamente em detalhes por Gomes (1995) e Gomes *et al.* (1994; 1996a,b,c, 2006) e alguns princípios foram pré-estabelecidos para coletas microbiológicas, os quais foram adaptados para este estudo e estão descritos a seguir:

- Coleta da saliva (S) - dispensada em recipiente vazio e estéril.
- Anestesia local.
- Foi realizado o desgaste da interface dente-restauração ou da coroa total + pino intra-radicular (formato recomendado para o uso do saca-pino MV (Trigona, Rio Claro, SP, Brasil) preservando a face interna da restauração.
- Isolamento absoluto.
- Descontaminação do grampo, lençol de borracha, arco e da face externa da coroa com água oxigenada 10v, NaOCl 2,5% e neutralização com tiosulfato de sódio 5% para evitar que descontaminação química da face externa da coroa interferisse no material a ser coletado (Möller, 1966).
- Coleta da coroa (C) – foi realizada durante a remoção do pino ou restauração e dos contaminantes coronários (cárie, cimento) – armazenada em Eppendorf estéril contendo 1,0 ml de meio de transporte VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993).
- Abertura coronária – forma de conveniência.
- Coleta do Endodonto (E) – durante a desobturação realizada sem solventes, utilizando brocas de Gates-Glidden + limas tipo K (Maillefer/ Dentsply, Balaigues, Suíça) a guta-percha removida foi armazenada em Eppendorf contendo 1,0 ml de VMGA III. Em casos de dentes bi ou trirradiculares a coleta era realizada no canal radicular mais amplo, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico.
- Utilização de localizador foraminal (Novapex, Forum Engineering Technologies, Rishon Lezion -Israel) – patência (desobstrução apical) e uma tomada radiográfica para verificar a remoção do material obturador.
- Após a desobstrução apical, foi coletado o exsudato dos dentes com drenagem via canal, ou então foi depositada solução salina no interior do canal radicular para a realização de uma coleta adicional. Foram utilizados cones de papel absorvente estéril (Maillefer/ Dentsply, Balaigues, Suíça) no comprimento do dente por 60 s, os quais foram armazenados no mesmo Eppendorf da coleta (E).

- Os Eppendorfs contendo as amostras microbiológicas foram imediatamente transportados para o laboratório de Microbiologia

A coleta das amostras dos canais radiculares (Fig. 2a) e das coroas foram realizadas sob fluxo contínuo de nitrogênio (Berg & Nord, 1973).

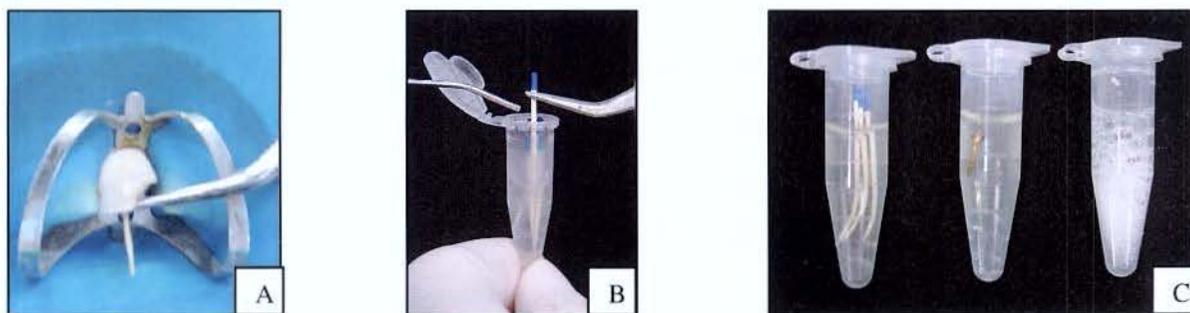


Figura 2. A – Coleta microbiológica. B - Eppendorf no momento da coleta, C – Eppendorfs contendo as amostras microbiológicas.

Após as coletas das amostras microbiológicas, o dente em questão foi retratado e restaurado pelo mesmo operador. Foi feita a preservação de todos os retratamentos realizados neste experimento até o presente momento e serão acompanhados durante alguns anos.

4.2. Processamento das amostras

Os processamentos das amostras foram realizados no laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP. Os meios de cultura foram utilizados na forma de pó desidratado e suplementos seletivos pré-fabricados, que foram preparados de acordo com as orientações do fabricante. O meio de transporte (VMGA III) foi preparado de acordo com a fórmula original (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993). (Anexo II)

Os Eppendorfs contendo as amostras da saliva, da coroa dental e do canal radicular (Fig. 2b) foram agitados por 60s dentro da câmara de anaerobiose, a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂. Alíquotas de 50 µL de cada uma destas amostras foram inoculadas em placas de petri contendo diversos meios de cultura e incubadas em diferentes condições gasosas, como descritos a seguir:

- Placas contendo BHI Agar* (Brain Heart Infusion Agar) + 5% de sangue de carneiro, incubadas em estufa de O₂ (aerobicamente), a 37°C, por 2 dias, para detecção de anaeróbios facultativos.
 - Placas pré-reduzidas de FAA* - “Fastidious Anaerobe Agar” (Lab M, Bury, UK) contendo 5% de sangue de carneiro + 600 µL de Menadione (Vitamin K3; 2-Methyl-1,4-naphthoquinone - SIGMA M5625) + 600 µL de Hemina (Hemin Bovine Minimum 80% – SIGMA H5533) que favorecem o crescimento das bactérias produtoras de pigmento negro, a 37°C numa atmosfera anaeróbica com 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento mais lento. Foram realizadas duas diluições seriadas (1/10 e 1/100) apenas das amostras de canais radiculares utilizando “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB - Lab M, Bury, UK), sendo inoculados 50µl de cada diluição em placas de FAA pré-reduzidas.
 - Placas de FAA contendo 5% de sangue de carneiro + NAL (ácido nalidíxico), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-positivos a actinomicetos.
 - Placas de FAA contendo 5% de sangue de carneiro + NAL + VAN (vancomicina), 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos.
 - Placas de FAA contendo 5% de sangue de carneiro + VAN + KAN (Kanamicina), 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos, principalmente bactérias de pigmento negro.
 - Placas de FAA contendo 5% de sangue de carneiro + NEO (neomicina), 37°C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar clostrídios e outros anaeróbios.
- Meios de cultura seletivos:
- Placas de Ágar m-Enterococcus – incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias, seletivo para a detecção de espécies de *Enterococcus* spp.
 - Placas de Ágar Mitis Salivarius* – incubadas em 10% CO₂, a 37°C, por 2 dias, seletivo para *S. mitis*, *S. salivarius* e *Enterococcus* spp. As amostras da saliva foram

diluídas até 10^{-6} utilizando “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB - Lab M, Bury, UK), antes de serem inoculadas neste meio.

- Placas de Ágar Sabouraud-dextrose acrescido de 0,1% de cloranfenicol – seletivo para detecção de espécies de leveduras, cujas placas foram incubadas por 4 dias à temperatura ambiente e depois incubadas em 10% CO_2 , a 37°C , por 2 dias (Vianna *et al.*, 2005).
- Placas de Ágar MacConkey - incubadas em 10% CO_2 , a 37°C , por 2 dias, seletivo para a detecção de espécies de enterobactérias.

*Observações: Para inoculação nos meios BHI, FAA e Mitis Salivarius as amostras da saliva foram diluídas até 10^{-6} utilizando “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB - Lab M, Bury, UK), sendo inoculados 50 μL das diluições 10^{-4} e 10^{-6} .

4.3. Cultivo, isolamento, incubação e identificação dos microrganismos

Após a incubação, foi analisada a morfologia das colônias nas placas iniciais (Placa mãe) em estereomicroscópio (Lambda Let 2. Atto Instruments Co., Hong Kong - Fig.3). Cada colônia diferente foi subcultivada para a obtenção de culturas puras. A diferenciação das colônias foi feita de acordo com as suas características macroscópicas na placa, observando-se: tamanho, cor, forma, textura, elevação, borda, superfície, opacidade e efeito no agar (nenhum, hemólise parcial ou total).

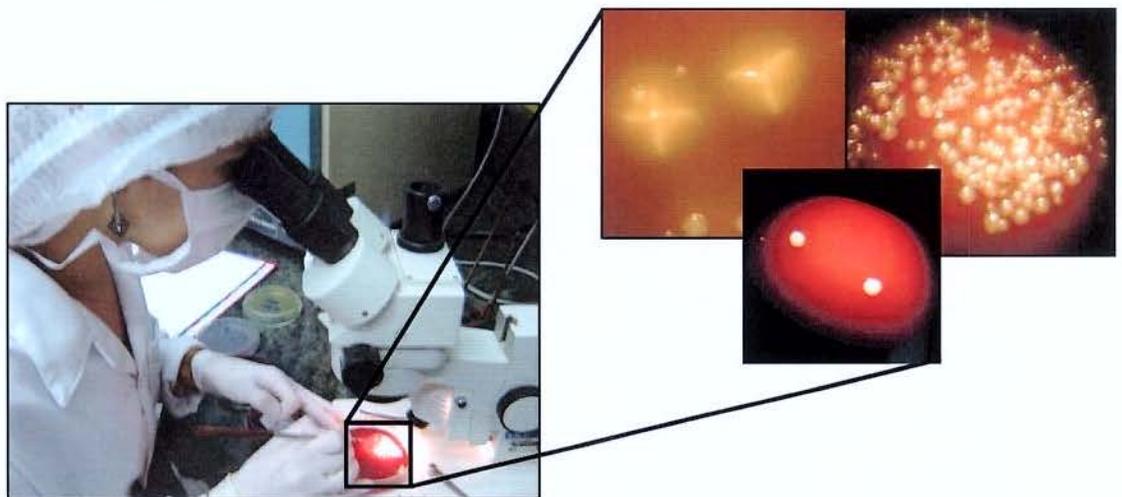


Figura 3. Análise do crescimento bacteriano através de lupa estereoscópica onde as colônias foram diferenciadas de acordo com as suas características macroscópicas.

A semeadura das placas subsequentes foi feita da seguinte forma: cada diferente colônia era transferida para uma placa de FAA pré-reduzida e para uma placa de BHI agar-sangue. As placas de FAA foram incubadas em câmara de anaerobiose para o crescimento de anaeróbios estritos e as placas de BHI foram incubadas em estufa de O₂ a 37°C, para o crescimento de microrganismos anaeróbios facultativos. Desta forma, as colônias bacterianas foram testadas quanto ao seu requerimento gasoso, ou seja, em qual condição gasosa houve um melhor crescimento bacteriano (Fig.4).

As anaeróbias estritas foram também incubadas em estufa de CO₂ (IG 150 CO₂ Incubator, Jouan S. A., Saint Herblain, Cedex, França), para a diferenciação entre anaeróbias estritas e capnofílicas. Assim, a identificação microbiana foi desenvolvida nas culturas puras por:

- Morfologia colonial
- Requerimento gasoso (Fig. 4)
- Caracterização morfológica nas leituras das lâminas destas colônias que receberam a coloração de Gram (Newprov – Produtos para Laboratório, Pinhais – PR, Brasil)
- Reação da catalase (ANEXO VI)
- Teste da oxidase em bactérias Gram-negativas e catalase-positivas (ANEXO VI)

Foram utilizados métodos de identificação comerciais, ou seja, testes bioquímicos em miniatura vendidos em Kits padronizados pela Biomérieux (BioMérieux SA, Marcy-l'Étoile, França). Estes possuem reagentes que evidenciam, pela mudança de cor, em determinados períodos, as exigências nutricionais e compostos específicos produzidos pelas bactérias. Os Kits fornecem gabaritos para finalizar a identificação, que pode ser verificada através do site “<http://industry.biomerieux-usa.com/industry/watertesting/api/apiweb.htm>”.



Figura 4. Requerimento gasoso utilizando a câmara de anaerobiose (A) e a estufa de CO₂ (B).

Os seguintes Kits padronizados (ANEXO IX) foram utilizados para a especificação primária dos organismos isolados:

- Rapid ID 32A (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os bastonetes Gram-negativos e Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios.
- API Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estafilococos e micrococcos (cocos Gram-positivos, catalase-positiva)
- API Strep (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para os estreptococos (cocos Gram-positivos, catalase-negativa)
- API 20 E (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para as enterobactérias (Bacilos entéricos Gram-negativos, catalase-positiva, oxidase-negativa).
- API NH (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* e *Actinobacillus* (cocos e bacilos Gram-negativos e facultativos, oxidase-positiva)
- API AUX (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para identificar espécies de *Candida*

4.4. Teste de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas dos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente

Todas as cepas de *Enterococcus faecalis* (8/30), assim como *Actinomyces* spp. e *Pepstreptococcus* spp. (ANEXO III) foram testadas quanto sua suscetibilidade/resistência através do método do E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia). Os agentes antimicrobianos testados foram:

- Benzilpenicilina (PG)
- Amoxicilina (AC)
- Amoxicilina+ácido clavulânico(XL)
- Eritromicina (EM)
- Azitromicina (AZ)
- Clindamicina (CM)
- Metronidazol (MZ)
- Vancomicina (VA)
- Cloranfenicol (CL)
- Tetraciclina (TC)
- Ciprofloxacina (CI)
- Rifampicina (RI)
- Moxifloxacina (MX)
- Gentamicina(GM)

O sistema do E-test consiste em uma fita plástica de 50mm de comprimento e 3mm de largura, que contém em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento. A fita do E-test pode detectar uma CIM que varia de 0,016 a 256 µg/ ml, com um total de 29 diferentes CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (Bolmström, 1993) (Fig. 5).

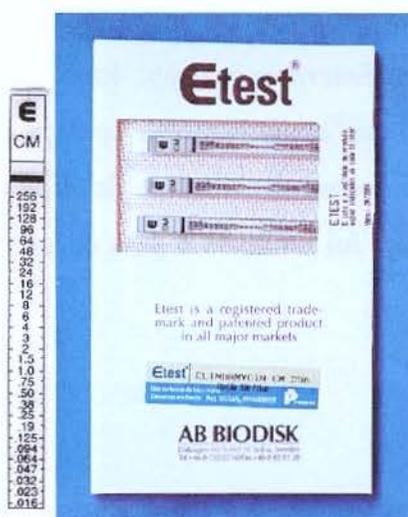


Figura 5. E-test

Para preparar o inóculo, após 24-48 h de incubação da espécie bacteriana em placas de ágar sangue, as colônias bacterianas foram transferidas para o meio líquido “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB) e agitadas para atingir a turbidez que equivale ao padrão 0,5 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo - SP, Brasil) para bactérias anaeróbias facultativas, que foi verificado no espectrofotômetro (MARCONI, Piracicaba - SP, Brasil).

Placas contendo 4 mm de espessura Mueller-Hinton ágar (OXOID, Hampshire, Inglaterra) foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, uniformemente, através de swab estéril, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test, que haviam sido previamente removidas do congelador e já se encontravam a temperatura ambiente cerca de 20 minutos, foram distribuídas nas placas com o auxílio de pinça estéril para cada substância a ser testada. O experimento foi executado em duplicata e sempre em fluxo laminar.

As placas foram incubadas em condições aeróbicas e a leitura realizada após 16-20 horas. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test, considerando o ponto de inibição completa de crescimento.

De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada seguindo o guia de interpretação da NCCLS.

Segundo o *National Commitee for Clinical Laboratory Standards*, a clindamicina não é clinicamente efetiva contra *Enterococcus spp.*, logo testes com esse antibiótico não são recomendados, pois mesmo que a clindamicina apareça efetiva *in vitro*, os isolados não devem ser reportados como suscetíveis. Para se determinar o perfil de suscetibilidade de espécies de *Enterococcus spp.* foi utilizado o guia de interpretação da NCCLS-M100 S15 (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores interpretativos de pontos de corte equivalentes das concentrações inibitórias mínimas - CIM ($\mu\text{g/ml}$) dos antimicrobianos avaliados nos testes de *Enterococcus* spp. (NCCLS- M100 S15)

Agentes antimicrobianos	Suscetível	Resistente
Benzilpenicilina (PG)	≤ 8	≥ 16
Amoxicilina (AC)	≤ 8	≥ 16
Amoxicilina + ácido clavulânico (XL)	≤ 8	≥ 16
Eritromicina (EM)	$\leq 0,5$	≥ 8
Azitromicina (AZ)	≤ 2	≥ 8
Clindamicina (CM)	R	R
Metronidazol (MZ)	R	R
Vancomicina (VA)	≤ 4	≥ 32
Cloranfenicol (CL)	≤ 8	≥ 32
Tetraciclina (TC)	≤ 4	≥ 16
Doxiciclina (DC)	≤ 4	≥ 16
Moxifloxacina (MX)	≤ 2	≥ 8
Ciprofloxacina (CI)	≤ 1	≥ 4
Rifampicina (RI)	≤ 1	≥ 4
Gentamicina (GM)	≤ 500	> 500

4.5. Análise estatística

Os dados coletados foram introduzidos numa planilha de cálculo Excel e estatisticamente analisados usando SPSS para Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). O teste de “Pearson chi-square”, ou “Fisher’s Exact Test” quando apropriado, foram utilizados para testar a hipótese nula de que não existe relação entre os aspectos clínicos e radiográficos dos dentes com tratamento endodôntico prévio e a presença de microrganismos específicos.

5. RESULTADOS

As coletas microbiológicas da saliva (n=30), da coroa dental (n=30) e dos canais radiculares (n=30), somam 90 amostras, as quais apresentaram 100% de crescimento microbiano (ANEXO III). Características clínicas e radiográficas foram observadas e estão discutidas na Tabela 3.

Tabela 3. Aspectos clínicos e radiográficos dos 30 dentes estudados.

No.	I	S	Dente	COROA	QUA REST	QUA TRAT	Total de micro	ESP PINO OBT	Limite apical	Diâm da lesão	FIS	Exud desob	DOR PREV	DOR PERC	TEP
1	38	M	11 uni	Resina pigmentada	Ruim	Ruim	6	-	1mm	6 mm	P	P	P	PV	10
2	36	M	15 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Ruim	3	1mm	2 mm	2mm	-	-	-	PH	10
3	33	F	22 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Bom	5	s/e	1mm	+ 20mm	-	-	-	-	10
4	28	M	34 bi	Resina/ Cotosol	Boa	Bom	1	-	1mm	3mm	-	-	-	-	+5
5	47	M	44 uni	Coroa Metálica	Boa	Bom	4	-	0mm	3mm	-	-	-	-	+5
6	38	F	22 uni	Resina/ Cotosol	Ruim	Bom	2	-	1mm	4mm	-	-	-	-	+5
7	42	M	22 uni	Pino/ Coroa Metálica	Boa	Ruim	2	2mm	2mm	2mm	-	-	-	-	+5
8	64	F	45 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Ruim	1	1mm	1mm	2mm	-	-	-	-	10
9	17	F	12 uni	Resina	Ruim	Ruim	5	-	0mm	5mm	-	-	-	-	+5
10	31	M	22 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Ruim	4	2mm	1mm	5mm	-	-	-	-	+5
11	50	M	12 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Bom	5	s/e	2mm	5mm	-	-	-	-	10
12	17	F	11 uni	Resina / Cárie	Ruim	Ruim	4	-	0,5mm	10mm	-	-	-	-	+5
13	85	M	35 uni	Amálgama	Boa	Ruim	8	-	3mm	3mm	-	-	-	-	10
14	52	F	15 uni	Pino / Coroa Metálica	Ruim	Ruim	4	2mm	4mm	+20mm	-	P	-	-	+20
15	52	F	14 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Ruim	2	2mm	5mm	+20mm	-	H	-	-	+20
16	43	F	34 uni	Resina	Boa	Bom	4	-	0mm	5mm	-	-	-	-	10
17	30	M	22 uni	Resina	Ruim	Bom	1	-	0mm	+ 10 mm	P	-	-	-	4
18	15	F	46 tri	Resina sem pigm	Boa	Bom	5	-	0mm	3mm	-	-	-	-	5
19	59	M	43 uni	Resina manchada	Ruim	Ruim	2	-	5mm	3mm	-	-	-	P	10
20	43	F	22 uni	Pino metálico / Coroa	Boa	Ruim	3	1mm	3mm	3mm	-	-	-	PV	10
21	61	F	23 uni	Pino met Relyx / Coroa	Ruim	Ruim	9	1mm	1mm	4mm	-	-	-	P	10
22	31	F	15 uni	Pino met Relyx / Coroa	Ruim	Ruim	6	2mm	0mm	4mm	-	-	P	PVH	2
23	43	F	46 tri	Amalgama e Resina	Ruim	Bom	2	-	0mm	+20mm	P	P	P	PV	6
24	59	M	31 uni	Resina manchada	Ruim	Ruim	1	-	3mm	+40mm	-	P	-	PVH	+30
25	59	M	41 uni	Resina manchada	Ruim	Bom	1	-	2mm	+40mm	-	P	-	PVH	+30
26	59	M	42 uni	Resina manchada	Ruim	Bom	2	-	2mm	+40mm	-	P	-	PVH	+30
27	30	M	11 uni	Resina manchada	Ruim	Ruim	2	-	3mm	+10mm	P	-	-	-	5
28	61	F	13 uni	Pino metal	Boa	Ruim	6	s/e	5mm	4mm	-	-	P	-	10
29	43	F	21 uni	Resina manchada	Ruim	Ruim	7	-	3mm	3mm	P	-	-	PVH	10
30	43	F	11 uni	Amalgama manchado	Boa	Bom	7	-	0mm	3mm	-	-	-	-	10

NOME: Nome do paciente. **I:** idade. **S:** sexo - M-masculino, F-feminino. **DENTE:** número do dente. Anatomia: unirradicular, birradicular, trirradicular. **COROA:** restauração da porção coronária. **QUA REST:** qualidade da restauração: Boa, Ruim. **OBT:** qualidade da obturação: Boa, Ruim. **QUA TRAT:** qualidade do tratamento endodôntico. **Total de micro:** total de microrganismos identificados. **ESP PINO OBT:** Espaços vazios entre o pino e a obturação, s/e: sem espaços vazios. **LIMITE APICAL:** em mm. **DIÂM DA LESÃO:** em mm. **FIS:** Fístula: P-Presente, (-) Ausente. **EXUD:** Exudato pós desobturação: (-) ausente, H-hemorrágico, P-purulento. **DOR PREV:** dor prévia: (-) Ausente, P-Presente. **DOR PERC:** dor à percussão (-) ausente, P-presente, PV-Percussão Vertical, PH-Percussão Horizontal. **TEP (Terapia Endodôntica Prévia):** anos.

A frequência das características clínicas e radiográficas está apresentada de forma resumida nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Características clínicas de 30 dentes com insucesso endodôntico.

Características	Frequência	Porcentagem
Dente		
11, 21	5	16,7%
12, 22	8	26,7%
13, 23	2	6,7%
14, 15	4	13,3 %
31, 41, 42	3	10%
34, 44	3	10%
43	1	3,3%
34, 44, 45	5	16,7%
46	2	6,7%
Anatomia		
unirradiculares	25	83,3%
birradiculares	3	10%
trirradiculares	2	6,7%
superiores	19	63,3%
inferiores	11	36,7%
Gênero		
Masculino	14	46,7%
Feminino	16	53,3%
Idade		
<30	4	13,3%
≥30	26	86,7%
Tempo de tratamento		
<4 anos	1	3,3%
4-10 anos	24	80%
>10 anos	5	16,7%
Qualidade da restauração		
Boa	15	50%
Ruim	15	50%
Dor prévia	4	13,3%
Dor à percussão	12	40%
Presença de fístula	5	16,7%

Tabela 5. Características radiográficas de 30 dentes com insucesso endodôntico.

Características	Número	Porcentagem
Tamanho da lesão		
1-4 mm	15	50%
5-10 mm	8	26,7%
>10 mm	7	23,3%
Limite apical da obturação		
0-2 mm do ápice	21	70%
3-5 mm do ápice	10	33,3%
Qualidade do tratamento		
Bom	12	40%
Ruim	18	60%
Presença de pino intraradicular	12	40%
Espaço entre o pino e a obturação	9	30%

Foram isolados 147, 86 e 114 microrganismos na saliva, coroa dental e canais radiculares, respectivamente. A prevalência de todas as espécies microbianas isoladas na saliva, na coroa e no canal radicular estão listadas na Tabela 6.

Tabela 6. Número e porcentagem de espécies microbianas isoladas da saliva, da coroa e dos canais radiculares de 30 pacientes com dentes associados ao insucesso endodôntico.

Espécies microbianas	Saliva*	Coroa	Endodonto
Actinobacteria			
<i>Actinomyces meyeri</i>	-	2(6,7%)	3(10%)
<i>Actinomyces naeslundii</i>	-	2(6,7%)	4(13,3%)
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	-	1(3,3%)	1(3,3%)
<i>Actinomyces viscosus</i>	-	5(16,7%)	4(13,3%)
<i>Actinomyces israelii</i>	-	2(6,7%)	4(13,3%)
<i>Propionibacterium acnes</i>	-	3(10%)	3(10%)
<i>Propionibacterium granulosum</i>	-	1(3,3%)	2(6,7%)
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 2	-	1(3,3%)	3(10%)
Bacteroidetes			
<i>Prevotella buccae</i>	-	1(3,3%)	2(6,7%)
<i>Prevotella intermedia</i>	-	1(3,3%)	-
<i>Capnocytophaga</i> spp.	-	2(6,7%)	-
Firmicutes			
<i>Enterococcus faecalis</i>	13(43,3%)	6(20%)	8(26,7%)
<i>Enterococcus faecium</i>	5(16,7%)	-	1(3,3%)
<i>Streptococcus sanguis</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Streptococcus mitis</i> 1	-	12(40%)	8(26,7%)
<i>Streptococcus constellatus</i>	-	2(6,7%)	-
<i>Streptococcus anginosus</i>	-	1(3,3%)	-
<i>Streptococcus mutans</i>	-	3(10%)	2(6,7)
<i>Streptococcus oralis</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Streptococcus salivarius</i>	-	2(6,7%)	1(3,3%)
<i>Streptococcus acidominimus</i>	-	3(10%)	2(6,7%)
<i>Streptococcus lactis</i>	-	-	-
<i>Streptococcus uberis</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Streptococcus intermedius</i>	-	1(3,3%)	-
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Peptostreptococcus micros</i>	-	-	2(6,7)
<i>Eubacterium limosum</i>	-	4(13,3%)	3(10%)
<i>Micrococcus lentus</i>	-	1(3,3%)	2(6,7%)
<i>Gemella morbillorum</i>	-	6(20%)	7(23,3%)
<i>Gemella haemolysans</i>	-	4(13,3%)	3(10%)
<i>Staphylococcus xylosum</i>	5(16,7%)	3(10%)	5(16,7%)
<i>Staphylococcus sciuri</i>	2(6,7%)	-	1(3,3%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	3(10%)	2(6,7%)	4(13,3%)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6(20%)	2(6,7%)	2(6,7%)
<i>Staphylococcus caprae</i>	1(3,3%)	-	-
<i>Staphylococcus lentus</i>	9(30%)	6(20%)	9(30%)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	-

Tabela 6. Número e porcentagem de espécies microbianas isoladas da saliva, da coroa e dos canais radiculares de 30 pacientes com dentes associados ao insucesso endodôntico (cont.).

Espécies microbianas	Saliva	Coroa	Endodonto
<i>Firmicutes</i>			
<i>Lactobacillus lactis cremoris</i>	-	1(3,3%)	2(6,7%)
<i>Veillonella spp.</i>	-	1(3,3%)	-
<i>Clostridium botulinum</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Clostridium bifermentans</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Clostridium tetani</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	-	3(10%)	1(3,3%)
<i>Proteus mirabilis</i>	1(3,3%)	2(6,7%)	2(6,7%)
<i>Enterobacter cloacae</i>	3(10%)	-	-
<i>Enterobacter agglomerans</i>	2(6,7%)	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	3(10%)	-	1(3,3%)
<i>Serratia marcescens</i>	1(3,3%)	2(6,7%)	2(6,7%)
<i>Serratia odorifera</i>	1(3,3%)	1(3,3%)	1(3,3%)
<i>Serratia liquefaciens</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	1(3,3%)	-	1(3,3%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	5(16,7%)	1(3,3%)	3(10%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1(3,3%)	1(3,3%)	1(3,3%)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1(3,3%)	1(3,3%)	1(3,3%)
<i>Pasteurella spp.</i>	-	-	1(3,3%)
<i>Proteobacteria</i>			
<i>Haemophilus influenzae</i>	-	1(3,3%)	-
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	-	1(3,3%)	-
<i>Fungi</i>			
<i>Candida albicans</i>	15(50%)	2(6,7%)	1(3,3%)

*Foram identificados na saliva apenas *Enterococcus spp.*, *Candida spp.*, *Staphylococcus spp.* e enterobactérias.

A prevalência de todos os gêneros isolados na saliva, na coroa e no canal radiculares estão relacionados na Tabela 7.

Tabela 7. Prevalência de *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias isolados na saliva, e da microbiota das coroas e dos canais radiculares.

GÊNEROS	SALIVA	COROA	ENDODONTO
<i>Streptococcus</i> spp.	-	18(60%)	11(36,7%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	17(56,7%)	12(40%)	15(50%)
<i>Actinomyces</i> spp.	-	9(30%)	12(40%)
<i>Enterococcus</i> spp.	13(43,3%)	6(20%)	8(26,7%)
<i>Gemella</i> spp.	-	10(33%)	8(26,7%)
<i>Propionibacterium</i> spp.	-	1(3,3%)	4(13,3%)
<i>Clostridium</i> spp.	-	2(6,7%)	4(13,3%)
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	-	-	3(10%)
<i>Eubacterium</i> spp.	-	3(10%)	3(10%)
<i>Bifidobacterium</i> spp.	-	1(3,3%)	3(10%)
<i>Prevotella</i> spp.	-	2(6,7%)	2(6,7%)
<i>Micrococcus</i> spp.	-	1(3,3%)	2(6,7%)
<i>Lactobacillus</i> spp.	-	1(3,3%)	2(6,7%)
<i>Veillonella</i> spp.	-	1(3,3%)	-
<i>Haemophilus</i> spp.	-	2(6,7%)	-
<i>Neisseria</i> spp.	-	-	-
Enterobactérias	8(26,7)	4(13,3)	5(16,7%)
Bacilos não-entéricos	6(20%)	1(3,3%)	3(10%)
<i>Candida</i> spp.	15(50%)	2(6,7%)	1(3,3%)

A figura 6 mostra número e porcentagem de microrganismos por canal radicular, sendo que 5 (16,7%) abrigavam apenas 1 microrganismo por canal radicular, 7 (23,3%) apresentavam 2 microrganismos, 2 (6,7%) apresentavam 3, 5 (16,7%) apresentavam 4, 4 (13,3%) apresentavam 5, 7 (23,3%) apresentavam 6 ou mais microrganismos por canal radicular. Deste modo, 40% das infecções persistentes estudadas foram consideradas “monoinfecções”, ou seja, presença de 1-2 microrganismos por canal radicular e 60% foram consideradas infecções polimicrobianas, contendo de 3 – 9 microrganismos por canal radicular.

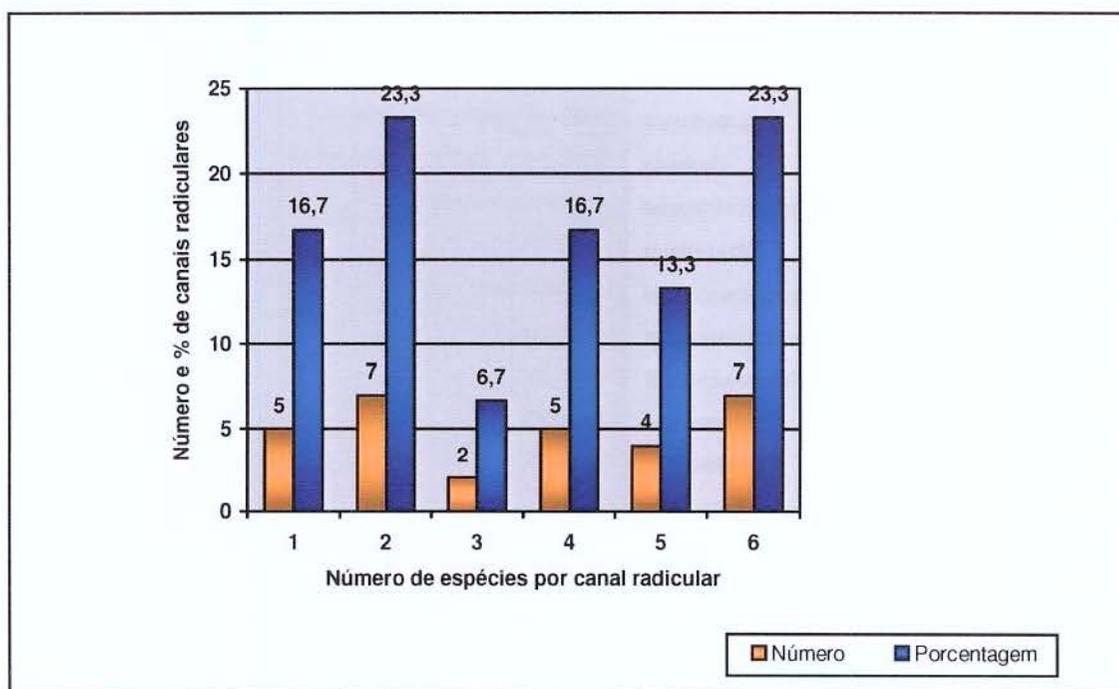


Figura 6. Número e porcentagem de espécies isoladas por canal radicular com insucesso endodôntico.

O número e porcentagem dos gêneros microbianos mais frequentemente isolados dos canais radiculares foram: *Staphylococcus* (15 - 50%), *Streptococcus* (11 - 36,7%), *Actinomyces* (12 - 40%), *Enterococcus*, *Gemella* (8 - 26,7%), *Propionibacterium*, *Clostridium* (4 - 13,3%), *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium* (3 - 10%), *Lactobacillus*, *Prevotella* (2 - 6,7%), *Candida* (1 - 3,3%) (Fig.7).

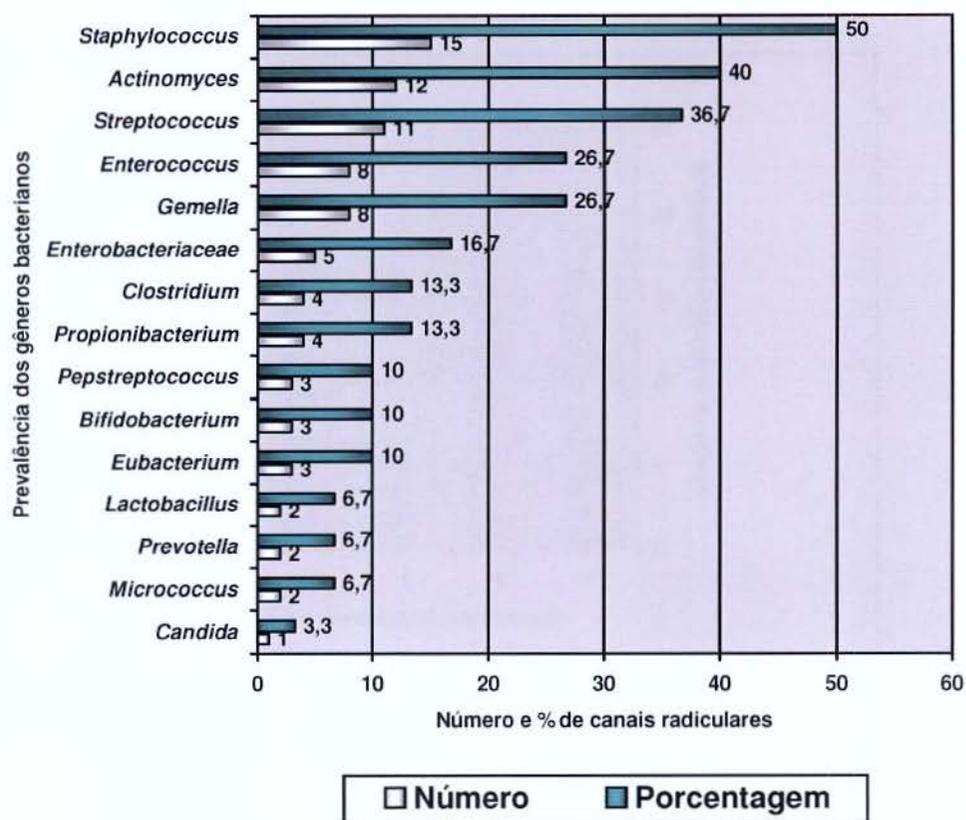


Figura 7. Prevalência dos gêneros microbianos isolados em 30 canais de dentes com insucesso endodôntico.

Das espécies microbianas isoladas nos canais radiculares, 81,5% eram anaeróbios facultativos, 18,5% anaeróbias estritas, predominantemente Gram-positivas (86%) e 14% Gram-negativas. Na saliva 100% dos microrganismos eram anaeróbios facultativos e 84% Gram-positivos. Na coroa 88% eram anaeróbios facultativos e 84% Gram-positivos (Fig.8). Fungos foram incluídos como Gram-positivos apesar de terem uma coloração específica.

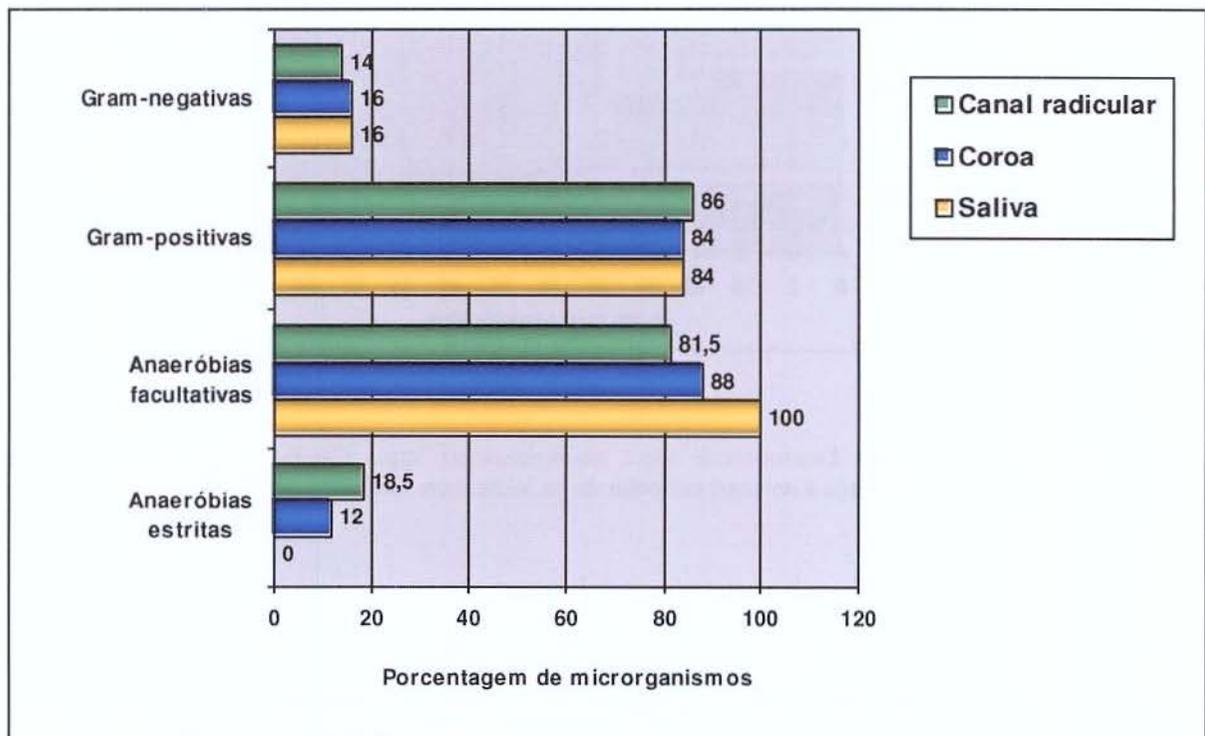


Figura 8. Frequência de microrganismos anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, Gram-positivos e Gram-negativos isolados na saliva, na coroa e nos canais radiculares de 30 pacientes com dentes com insucesso endodôntico.

Enterococcus spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias foram isolados em 26,7%; 50%; 3,3% e 16,7%, dos canais radiculares, em 20%; 40%; 6,7 % e 13,3%, das coroas e em 43,3%; 56,7%; 50% e 26,7% da saliva, respectivamente (Fig.9).

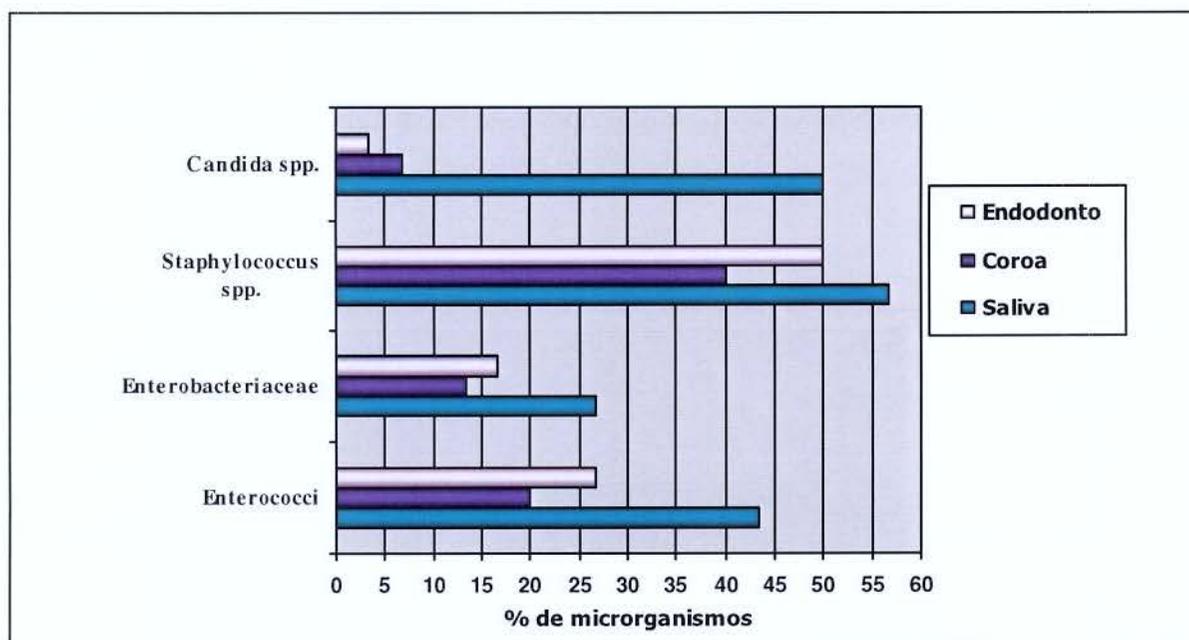


Figura 9. Prevalência de *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias identificados na saliva, na coroa e no canal radicular de pacientes com insucesso endodôntico.

Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) e a classificação baseada nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S15) como S = Suscetível, I = Intermediário e R = Resistente das oito espécies de *Enterococcus faecalis* testadas estão descritos nas Tabelas 8 e 8, respectivamente.

Tabela 8. Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos antibióticos e classificação em suscetível, intermediário e resistente baseada nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S15) das oito espécies de *Enterococcus faecalis* testadas.

<i>Enterococcus faecalis</i> (n=8)																	
Agentes antimicrobianos	Número dos casos / valores e classificação das CIMs																
	1	3	5	7	8	10	21	28	CIM ($\mu\text{g/mL}$)								
Rifampicina (RI)	16 25	R	16	R	.75 25	S	256	R	16	R	4	R	1.5	R	256	R	.016 - 256
Metronidazol (MZ)	6	R	256	R	6	R	256	R	256	R	256	R	256	R	256	R	.016 - 256
Amox. + ac. clav. (XL)	1.0	S	1.0	S	1.0	S	.75	S	.02 3	S	.016	S	1.0	S	1.0	S	.016 - 256
Benzilpenicilina (PG)	32	R	3	S	8	S	3	S	32	R	32	R	2	S	32	R	.002 - 32
Azitromicina (AZ)	8	R	4	I	12	R	8	R	16	R	256	R	12	R	96	R	.016 - 256
Gentamicina (GM)	3	S	3	S	24	S	3	S	3	S	.016	S	3	S	3	S	.016 - 256
Moxifloxacina (MX)	2	S	.50	S	.75	S	.19	S	2	S	32	R	.19	S	.50	S	.002 - 32
Doxiciclina (DC)	12	I	.75	S	2	S	256	R	256	R	24	R	12	I	4	S	.016 - 256
Amoxicilina (AC)	1.0	S	1.0	S	1.0	S	1.0	S	.75	S	.016	S	.75	S	256	R	.016 - 256
Cloranfenicol (CL)	16	I	16	I	6	S	256	R	256	R	256	R	24	I	16	I	.016 - 256
Clindamicina (CM)	16	R	256	R	16	R	16	R	4	R	.016	R	16	R	64	R	.016 - 256
Ciprofloxacina (CI)	1.0	S	2	I	-	-	.75	S	-	-	-	-	1.0	S	1.5	I	.002 - 32
Eritromicina (EM)	-	-	.25	S	-	-	3	I	-	-	-	-	1.5	I	256	R	.016 - 256
Vancomicina (VA)	-	-	4	S	-	-	-	-	-	-	-	-	2	S	256	R	.016 - 256
Tetraciclina (TC)	-	-	.50	S	-	-	-	-	-	-	-	-	128	R	.19	S	.016 - 256

S = Suscetível, I = Intermediário e R = Resistente

Todas as espécies de *Enterococcus faecalis* 8/8(100%) foram sensíveis à amoxicilina + ácido clavulânico e à gentamicina, 7/8 (87,5%) sensíveis à amoxicilina e à moxifloxacina. Entretanto, 8/8 (100%) das cepas são resistentes à clindamicina segundo a NCCLS (M100 S15), 7/8 (87,5%) à azitromicina, rifampicina e cloranfenicol e 1/8 (25%) à eritromicina (Tabela 9).

Tabela 9 – Índice de Suscetibilidade (S), Suscetibilidade intermediária (I) e Resistência (R) antimicrobiana das espécies de *Enterococcus faecalis* e concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% e 90% dos isolados respectivamente.

<i>Enterococcus faecalis</i> (n=8)						
Agentes antimicrobianos	CIM (µg/mL)		Índice de Suscetibilidade			
	CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ *	Intervalo de CIM	S	I	R
Rifampicina (RI)	16	256	0,75 - 256	12,5%	-	87,5%
Metronidazol (MZ)	256	256	>256	-	-	100%
Amoxic+ ac. Clav. (XL)	1,0	1,0	0,016 – 1,0	100%	-	-
Benzilpenicilina (PG)	8	32	2 - 32	50%	-	50%
Azitromicina (AZ)	12	96	4 - 256	-	12,5%	87,5%
Gentamicina (GM)	3	24	0,016 - 24	100%	-	-
Moxifloxacina (MX)	0,50	2	2 - 32	87,5%	-	12,5%
Doxiciclina (DC)	12	256	0,75 - 256	37,5%	25%	37,5%
Amoxicilina (AC)	1,0	1,0	0,016 - 256	87,5%	-	12,5%
Cloranfenicol (CL)	16	256	6 - 256	12,5%	50%	37,5%
Clindamicina (CM)	16	64	0,016 - 64	-	-	100%
Ciprofloxacina (CI)**	1,0	1,5	0,75 – 2,0	60%	40%	-
Eritromicina (EM)**	1,5	3	0,25 - 256	25%	50%	25%
Vancomicina (VA)**	4	4	2 - 256	66,6%	-	33,4%
Tetraciclina (TC)**	0,50	0,50	0,19 - 128	66,6%	-	33,4%

* CIM₅₀= concentração inibitória mínima incluindo 50% das amostras.

CIM₉₀= concentração inibitória mínima incluindo 90% das amostras.

**os antibióticos CI, EM, VA e TC foram testados com 5 cepas (CI), 4 cepas (EM) e 3 cepas (VA e TC).

6. DISCUSSÃO

Um dos grandes questionamentos que perduram na endodontia moderna é por que dentes que aparentemente bem tratados endodonticamente, bem restaurados e sem presença de sinais e/ou sintomas clínicos apresentam lesões periapicais. O conhecimento da microbiologia da saliva dos pacientes e do canal radicular dos dentes tratados endodônticamente com lesões periapicais é uma tentativa de se descobrir os fatores que causam o insucesso da terapia endodôntica.

As espécies isoladas dos canais radiculares são típicas da microbiota de dentes com insucesso endodôntico, com prevalência dos gêneros bacterianos: *Staphylococcus* (50%), *Streptococcus* (36,7%), *Actinomyces* (40%) e *Enterococcus*, (26,7%), o que corrobora com os achados da literatura (Engström, 1964; Möller, 1966; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, (1998); Peciuliene *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003 a,b; Siqueira & Roças, 2004; Roças *et al.*, 2004; Fouad *et al.*, 2005; Kaufman *et al.*, 2005).

A preocupação maior deste estudo foi cumprir o protocolo das coletas microbiológicas mantendo a cadeia asséptica. Portanto a prevalência do gênero *Staphylococcus* spp. não representa contaminação externa. Estes microrganismos têm sido isolados de lesões periapicais persistentes sem comunicação com a cavidade bucal (Tronstad *et al.* 1987; Wayman *et al.*, 1992). Cheung & Ho (2001) também identificaram *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp., como sendo os microrganismos mais freqüentemente isolados dos dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais crônicas.

Alguns trabalhos têm demonstrado a persistência de espécies de *Staphylococcus* spp. (Goldman & Pearson, 1969), *Lactobacillus* spp., *Streptococcus* spp. (Chávez de Paz, 2003; Gomes *et al.*, 1996b) nas coletas após a realização do preparo químico-mecânico dos canais radiculares de dentes com lesões periapicais. Isto pode significar que a microbiota encontrada no retratamento endodôntico pode ser remanescente da terapia endodôntica prévia e sua persistência pode ter mantido a lesão periapical, de forma crônica, ou então, em lenta regressão, permanecendo em equilíbrio com o sistema imunológico, mas podendo reagudizar e evidenciar ou não alguns sinais e sintomas clínicos.

Candida albicans foi isolada em 1 (3,3%) dos 30 canais estudados e estava presente em 50% da saliva dos pacientes, concordando com Sundqvist *et al.* (1998), Molander *et al.* (1998), Hancock *et al.* (2001) e Pinheiro *et al.* (2003b) que também isolaram *Candida albicans* com pouca prevalência nos canais radiculares. Egan *et al.* (2002) relataram ter encontrado uma correlação entre a presença de fungos na saliva e nos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. Nair *et al.* (1990a), utilizando a microscopia eletrônica de varredura, detectaram a presença de fungos em canais de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais e relacionaram a presença desses microrganismos com o insucesso endodôntico.

De acordo com as investigações anteriores da microbiota do insucesso endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000; Pinheiro *et al.*, 2003a,b) este estudo foi igualmente representado por bactérias anaeróbias facultativas (81,5%) e Gram-positivas (86%). Esta microbiota difere substancialmente dos canais radiculares com polpas necrosadas, que apresentam uma flora polimicrobiana, predominantemente anaeróbia, com equilíbrio de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Möller, 1966, 1992; Baumgartner, 1991; Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994, 1996 a,b,c; Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998). Esses dados foram confirmados por estudos recentes sobre infecções de dentes com tratamento endodôntico associados a lesões periapicais (Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Rolph *et al.*, 2001; Egan *et al.*, 2002; Pinheiro *et al.*, 2003a; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004; Adib *et al.*, 2004).

O presente estudo isolou 8/30 (26,7%) *Enterococcus faecalis* dos canais radiculares, concordando com estudos anteriores (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Peciulienė *et al.*, 2000, 2001; Hancock *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003a,b; Siqueira & Rôças, 2004; Rôças *et al.*, 2004; Adib *et al.*, 2004; Fouad *et al.*, 2005). Na literatura, *Enterococcus faecalis* é frequentemente o microrganismo mais isolado dos canais radiculares associados ao retratamento endodôntico e sua prevalência varia de 24 a 70% no método de identificação por cultura (Tabela 1). Porém, Cheung & Ho (2001) e Rolph *et al.* (2001) não isolaram cepas de *E. faecalis* em seus estudos. Concordando com nosso trabalho, Fouad *et al.* (2005) isolaram 22% entre os casos de retratamento estudados,

entretanto, de acordo com a literatura, era esperada uma maior prevalência deste microrganismo.

Kaufman *et al.* (2005) identificaram *E. faecalis* em casos de retratamento endodôntico com e sem lesão periapical, e relataram que são poucas as evidências de que as cepas são as únicas a causar o insucesso endodôntico. Por isso, pode ser cedo para direcionar a terapia endodôntica no intuito de erradicar um único microrganismo, o qual pode não ser o principal responsável pela recidiva da doença.

Por outro lado, Gomes *et al.* (2006) identificaram *E. faecalis* em 46,6% dos casos de insucesso pelo método de cultura, e em 76% através da análise por métodos moleculares das mesmas amostras, confirmando que *E. faecalis* é encontrado numa frequência ainda maior em casos de insucesso endodôntico. O mesmo trabalho encontrou *E. faecalis* na maioria (82%) dos casos de polpas necrosadas quando analisado pelo método molecular, enquanto pela cultura das mesmas amostras, o microrganismo foi raramente isolado, mostrando que o *E. faecalis* está presente na infecção primária, porém em pequena quantidade, não detectável pelo método da cultura. O crescimento dessa espécie pode ser favorecido por mudanças ecológicas no canal radicular após o preparo químico-mecânico, uso de medicações intra-canais ou obturação do canal radicular, facilitando a seleção de microrganismos, ou então, pelo tratamento em múltiplas sessões usando selamento coronário provisório, por isso detectamos uma microbiota mais resistente na infecção secundária.

O presente estudo identificou o *E. faecalis* como único microrganismo em apenas um caso clínico. Discordando de Sundqvist *et al.* (1998) e Pinheiro *et al.* (2003 a,b) que isolaram *E. faecalis* como único microrganismo encontrado no canal, confirmando os achados de Fabricius *et al.* (1982), que mostraram que *Enterococcus* apresentam a capacidade de sobreviver em canais radiculares como microrganismos únicos sem a relação cooperativa de outras bactérias. Além desses fatores, *Enterococcus faecalis* tem a capacidade de invadir os túbulos dentinários, podendo facilitar sua fuga aos procedimentos químico-mecânicos (Love, 2001) e conseguem suportar períodos prolongados de ausência de nutrientes, manterem-se na fase latente e voltar a crescer quando os nutrientes se tornarem disponíveis (Figor *et al.*, 2003). Esses nutrientes podem ser provenientes de

fluidos teciduais da região periapical ou de infiltrações coronárias e podem servir de substrato para as cepas que sobreviveram à terapia endodôntica, mantendo a infecção intraradicular. Estes microrganismos também têm demonstrado resistência ao hidróxido de cálcio que é a medicação intracanal comumente utilizada para a desinfecção dos canais radiculares (Haapasalo & Orstavik, 1987). Todos esses fatores podem contribuir para a alta prevalência desses microrganismos em dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais (Siqueira & Roças, 2004).

Quanto ao método de cultura utilizado em nosso estudo, foram isolados microrganismos viáveis em 100% das amostras ($n=90$) dos 30 pacientes estudados. Esta elevada taxa de microrganismos isolados de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico pode ser devido ao uso de meios seletivos e não seletivos. Portanto, difere dos achados de Molander *et al.* (1998), Sundqvist *et al.* (1998), Peciulienė *et al.* (2000) e Pinheiro *et al.* (2003), os quais, não detectaram crescimento bacteriano em 26,6%; 55,6%; 20% e 15% dos casos de dentes com tratamento endodôntico prévio, respectivamente. Entretanto, a presença de culturas negativas não significa a ausência total de microrganismos. Métodos de identificação por PCR mostram que os microrganismos estão presentes, mas muitas vezes não estão viáveis dentro do canal radicular (Siqueira & Roças, 2004). Embora as técnicas de coleta e cultura microbiológicas utilizadas nestes estudos sejam adequadas para o cultivo de bactérias sensíveis ao oxigênio (Gomes, 1995; Gomes *et al.*, 1994, 1996 a,b,c) é possível que alguns microrganismos tenham sido perdidos durante a coleta microbiológica por estarem presentes em áreas inacessíveis à coleta, ou em quantidade muito pequena no canal radicular.

O presente trabalho identificou em 18/30 (60%) casos, 3 a 9 espécies de microrganismos por canal radicular, sendo o restante (40%) caracterizado como monoinfecções, apresentando 7 casos com 2 microrganismos por canal e 5 casos com apenas 1 microrganismo por canal radicular (Fig.2). Essa diferença entre os trabalhos anteriores (Fabricius *et al.*, 1982, Sundqvist *et al.*, 1998; Figor *et al.* 2003; Pinheiro *et al.* 2003 a,b) e os nossos achados quanto à frequência de monoinfecções e infecções polimicrobianas pode estar relacionada a alguns fatores, como por exemplo: a qualidade da

terapia endodôntica prévia e das restaurações presentes nestes dentes, ao tamanho das lesões associadas ou mesmo as diferentes metodologias empregadas nas pesquisas.

No presente estudo foi encontrado 10/30 (33,3%) casos, nos quais a qualidade do tratamento endodôntico foi considerada ruim e apresentavam 3 a 9 espécies de microrganismos por canal radicular. Entretanto, não houve uma relação estatisticamente significativa entre o número de espécies por canal radicular e as características radiográficas da qualidade da obturação. Este resultado está de acordo com Pinheiro *et al.* (2003b) que detectou mais de 3 microrganismos em canais mal-obturados, porém mostrando uma correlação estatisticamente significativa entre os achados. De acordo com Sundqvist *et al.* (1998) e Pinheiro *et al.* (2003b) os dentes mal obturados possuem uma microbiota semelhante a uma infecção primária. Siqueira & Roças (2004) encontraram um maior número de espécies bacterianas em canais onde a distância entre o material obturador e o ápice era maior que 2 mm quando comparado com canais obturados no limite de 2 mm ou menos do ápice. Além disso, em ambas as situações, os autores encontraram maior número de espécies bacterianas por canal, concordando com este estudo, apesar da diferença das técnicas utilizadas para identificação microbiana.

Outra hipótese para a infecção polimicrobiana encontrada neste estudo está na metodologia, onde a guta-percha infectada do canal radicular foi coletada durante a desobturação com brocas de Gates-glidden e limas e, depois de desobturado o canal e o comprimento de dente estabelecido com o localizador foraminal foi realizada uma coleta adicional com cones de papel absorvente. Deste modo, a quantidade do material infectado coletado por essa técnica parece ser maior que a dos trabalhos anteriores (Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003a,b), onde os microrganismos podem ter sido eliminados durante a remoção do material obturador, mesmo quando utilizaram apenas métodos mecânicos e sem solventes.

Na análise estatística foi observada maior incidência de retratamento endodôntico nos incisivos laterais superiores 8/30 (26,7%), confirmando mais uma vez a influência das dificuldades anatômicas na desinfecção do sistema de canais radiculares. Quanto ao tamanho da lesão medida em mm pela radiografia periapical, observamos 11/30 (36,6%) casos com lesões maiores que 4 mm associadas à presença de 3 a 9 espécies de

microrganismos por canal radicular. Porém, não se detectou diferença estatística significativa entre os achados clínicos e radiográficos deste estudo.

Os resultados encontrados em nosso estudo mostram que *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias estão presentes na saliva dos pacientes submetidos ao retratamento endodôntico. Poucos estudos (Egan *et al.*; 2002) associaram a microbiota da saliva ao insucesso endodôntico, porém, corroborando com este estudo, Sedgley *et al.* (2005, 2006) detectaram *E. faecalis* na cavidade oral dos pacientes que estavam em tratamento endodôntico, principalmente nos casos onde havia uma comunicação dos canais com a cavidade bucal. Entretanto, muitos questionamentos ainda existem sobre as condições que levam as espécies de *E. faecalis* a infiltrar em dentes restaurados e tratados endodonticamente, e subseqüentemente contribuir para sua patogenicidade (Sedgley *et al.*, 2006).

A análise estatística mostrou que 15 (50%) dentes indicados para o retratamento endodôntico apresentavam restaurações consideradas ruins e 8 destes casos estavam associados a infecções polimicrobianas, porém não foi estatisticamente significativa. De acordo com Swartz *et al.* (1983), dentes com restaurações coronárias impróprias ou ausentes apresentam um índice de sucesso significativamente menor quando comparado aos dentes com restaurações adequadas. Além disso, Pinheiro *et al.* (2004) associaram restaurações defeituosas ou ausentes com a presença de *Streptococcus* spp. e *Candida* spp. que são microrganismos encontrados na cavidade oral. Assim, Helin *et al.* (2002) e Hommez *et al.* (2002) recomendam o selamento coronário definitivo como parte integrante do tratamento endodôntico para a obtenção do sucesso endodôntico. Do mesmo modo, o presente estudo detectou os mesmos microrganismos na saliva, na coroa e no canal radicular, podendo desta maneira afirmar a importância da restauração definitiva e imediata ao tratamento endodôntico e se possível utilizada entre sessões do tratamento endodôntico. O sucesso do tratamento e do retratamento endodôntico conseqüentemente dependem, do controle da assepsia durante o tratamento, da máxima eliminação de microrganismos durante o preparo químico-mecânico, de uma obturação hermética e também da prevenção da recontaminação do canal radicular.

Segundo Saunders & Saunders (1994) e Siqueira (2001), o insucesso endodôntico ocorre devido a uma possível infiltração coronária. Poucos estudos clínicos *in vivo* (Egan *et al.*, 2002; Sedgley *et al.*, 2006) tentam relacionar a microbiota da saliva, da coroa e do canal radicular. O presente trabalho investigou a possibilidade de inter-relação desta microbiota através de técnicas microbiológicas utilizando vários meios de cultura seletivos para detectar todos os possíveis microrganismos envolvidos no insucesso endodôntico. Entretanto, todos os achados deste estudo podem significar apenas uma coincidência em sua igualdade, pois o método de identificação por cultura não pode provar que esses microrganismos são idênticos, porém é necessário utilizá-lo para sabermos quais microrganismos encontram-se viáveis dentro do canal radicular e a partir do isolamento e identificação das espécies podemos planejar a identificação por PCR. Portanto trabalhos futuros devem tentar correlacionar a similaridade das microbiotas do canal e da saliva, através de técnicas moleculares.

Suscetibilidade antimicrobiana de *Enterococcus faecalis* isolados

Os resultados dos testes de suscetibilidade de 8 espécies de *Enterococcus faecalis* isolados no presente trabalho através do método do E-test, mostraram que essas espécies foram suscetíveis à amoxicilina e a moxifloxacina (87,5%), mas os melhores resultados foram da amoxicilina + ácido clavulânico e da gentamicina (100%). Assim, pode-se observar que algumas cepas de *E. faecalis* de canais radiculares com insucesso endodôntico apresentaram um aumento na resistência a amoxicilina, podendo aumentar ainda mais com uso indiscriminado deste antibiótico. Segundo Forbes *et al.* (1998), quando um microrganismo se torna menos suscetível a um determinado agente antimicrobiano, do que o que era anteriormente observado, ele está adquirindo uma resistência biológica a essa droga. Os autores explicaram que a resistência biológica não coincide necessariamente com a resistência clínica, que só é adquirida quando esses microrganismos deixam de ser suscetíveis à droga de tal forma que essa não seja mais efetiva clinicamente. Os autores ressaltaram que o desenvolvimento da resistência antimicrobiana é um processo evolutivo, e que é de fundamental importância o seu conhecimento e acompanhamento. Em casos de

retratamento endodôntico, *E. faecalis* podem entrar na corrente sanguínea, causar uma bacteremia, e ser uma possível causa, em situações de risco, da endocardite bacteriana.

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

O presente estudo detectou cepas de *E. faecalis* 100% resistentes a clindamicina e ao metronidazol. Segundo a NCCLS, aminoglicosídeos (salvo em altas concentrações), cefalosporinas, clindamicina e sulfametoxazol-trimetoprim podem parecer ativos *in vitro*, mas não são clinicamente eficazes e não deve ser relatado como sensíveis. Microrganismos Gram-positivos, como *E. faecalis*, apresentam-se resistentes ao metronidazol, sendo este antibiótico eficaz para Gram-negativos.

A maioria das espécies de *Enterococcus faecalis* estudadas (87,5%) apresentaram-se resistentes quando testadas com o antibiótico azitromicina. Esse resultado está de acordo com os achados de Fass (1993) que mostrou a azitromicina com menor eficácia contra *Enterococcus* spp.

No presente estudo, a eritromicina foi testada contra 4 cepas de *E. faecalis*, sendo que 25% apresentaram-se suscetíveis, 50% suscetibilidade intermediária e 25% resistentes, com grande variação das CIMs (0,25 – >256 µg/ml) no crescimento de *Enterococcus faecalis*, como observado no trabalho de Nord & Wadström (1973). Esses resultados demonstraram que as espécies de *Enterococcus faecalis* isoladas nesse estudo necessitaram de uma maior concentração de eritromicina para sofrer inibição. Estudos anteriores (Zeldore & Ingle, 1962; Engström, 1964; Matusow, 1981) não detectaram resistência a eritromicina entre as espécies de *Enterococcus* spp. isoladas dos canais radiculares. Entretanto, Heintz *et al.* (1975) detectaram sensibilidade a eritromicina em 96%, enquanto Stern *et al.* (1990) detectaram em 61,2% das cepas de *Enterococcus* spp. estudadas. Assim, foi possível observar que a CIM da eritromicina, quando testada contra *Enterococcus* spp., tem

aumentado com o decorrer dos anos, havendo um aumento da resistência das cepas de *E. faecalis* testadas *in vitro*.

Nossos resultados mostraram que as cepas de *E. faecalis* foram 100% suscetíveis à amoxicilina + ácido clavulânico e à gentamicina, 87,5% a amoxicilina e 60% à ciprofloxacina. Pinheiro *et al.* (2004) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de 21 cepas de *E. faecalis* isolados de canais com insucesso endodôntico com lesão periapical persistente. Concluíram que *E. faecalis* foram totalmente suscetíveis “*in vitro*” a amoxicilina, amoxicilina com ácido clavulânico, vancomicina e moxifloxacina. A maioria das cepas foram também suscetíveis ao cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina e ciprofloxacina. Eritromicina e azitromicina apresentaram baixa suscetibilidade, portanto menos efetivas. Por outro lado, Vigil *et al.* (1997) estudaram o padrão de suscetibilidade de microrganismos isolados de lesões periapicais persistentes, e não encontraram evidências claras de resistência antibiótica significativa entre as cepas estudadas.

Entre as cepas de *Enterococcus faecalis* testadas a amoxicilina + ácido clavulânico ou a gentamicina (100%) e amoxicilina ou moxifloxacina (87,5%) apresentaram melhor atividade antimicrobiana, quando comparada à benzilpenicilina (50%). De acordo com Sedgley *et al.* (2005) *E. faecalis* foram suscetíveis a ampicilina, benzilpenicilina, gentamicina e vancomicina. Dahlén *et al.* (2000) encontraram cepas de enterococos resistentes a benzilpenicilina, ampicilina, clindamicina, metronidazol e tetraciclina, enquanto Noda *et al.* (2000) encontraram cepas resistentes a cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina. Logo, em pacientes de risco, ou quando indicada terapia antibiótica durante o retratamento endodôntico, os resultados do nosso trabalho suportam a escolha da amoxicilina + ácido clavulânico como primeira opção de droga terapêutica.

Estudos envolvendo a microbiologia de dentes tratados endodônticamente associados a lesões periapicais tentam investigar as causas do insucesso da terapia endodôntica, mas ainda se faz necessária à continuidade das pesquisas sobre o assunto para sabermos de onde vêm tais microrganismos. Assim, se for conhecida a suscetibilidade/ resistência microbiana aos procedimentos endodônticos haveria uma melhora da qualidade do tratamento e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso do retratamento. Além disso, novas pesquisas deverão utilizar um número maior de espécies bacterianas e outros gêneros bacterianos

associados ao insucesso endodôntico para um maior conhecimento do padrão de suscetibilidade aos antibióticos.

7. CONCLUSÃO

Baseado nas condições experimentais utilizadas em nosso estudo de identificação microbiana pelo método de cultura e nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias foram identificados nos canais radiculares, nas coroas e na saliva dos pacientes, porém não se pode provar se esses microrganismos são idênticos.
- A microbiota dos canais de dentes tratados endodonticamente é composta em sua maioria por bactérias anaeróbias facultativas, predominantemente Gram-positivas.
- Os gêneros microbianos isolados dos canais radiculares foram: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Gemella*, *Propionibacterium*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Candida*.
- O número de espécies microbianas nas infecções de dentes com insucesso endodôntico variou de 1 a 2 microrganismos por canal radicular em 40% dos casos e observou-se em 60% dos casos uma colonização bacteriana com 3 ou mais espécies.
- As infecções polimicrobianas do insucesso endodôntico estavam mais associadas a alguns achados clínicos e radiográficos, tais como: restaurações coronárias consideradas ruins, canais mal-obturados e lesões periapicais ≥ 4 mm, porém não houve diferença estatisticamente significativa.
- A maior incidência de retratamento endodôntico foi observada nos incisivos laterais superiores.
- As cepas de *Enterococcus faecalis* estudadas foram 100% suscetíveis a amoxicilina + ácido clavulânico e gentamicina.

REFERÊNCIAS*

Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. *Aust Dent J* 1990; 35(1):50-60.

Abou-rass M & Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998; 31: 39-47.

Ada Council of Scientific Affairs. Antibiotics use in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1997; 128: 648.

Adib V, Spratt D, NG Y-L, Gulabivala K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J* 2004; 37: 542-551.

Allen RK, Newton CW, Brown CE. A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *J Endod* 1989; 15: 261-266.

Andrade EA, Passeri LA, Mattos-Filho TR. Prevenção da endocardite bacteriana – novas recomendações da American Heart Association. *Rev Assoc Paul Cir Dent* 1998; 52: 353-7.

Andrade ED. *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas; 1999, 188 p.

Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR. β -lactamase production and susceptibilities to amoxicilin, amoxicilin-clavulanate, ticarcilin, ticarcilin-clavulanate, cefoxitin, imipinem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis Bacteroides* isolates and 129 *Fusobateria* from 28 U.S. centers. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 1546-50.

Appelbaum PC, Spangler SK, Shiman R, Jacobs MR. Susceptibilities of 540 anaerobic Gram-negative bacilli to amoxicilin, amoxicilin-BRL 42715, amoxicilin-clavulanate, temafloxacin, and clindamycin. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 1140-3.

Baker K, Fotos PG. The management of odontogenic infections – a rationale for appropriate chemotherapy. *Dent Clin North Am* 1994; 38: 689-706.

Baker PJ, Evans RT, Slots J, Genco RJ. Antibiotic suscepibility of anaerobic bacteria from human oral cavity. *J Dent Res* 1985; 64: 1233-44.

Barnard D, Davies J, Figdor D. Susceptibilities of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *Int Endod J* 1996; 29: 320-6.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Baumgartner JC. Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. *Curr Opin Dent* 1991; 1: 737-43.
- Baumgartner JC, Falker WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17: 380-383.
- Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infection. *J Endod* 1999; 25: 413-5.
- Bender IB, Seltzer S. Combination of antibiotics and fungicides used in treatments of the infected pulpless tooth. *J Am Dent Assoc* 1952; 29: 235-41.
- Bender IB, Seltzer S, Sotano W. Endodontic success-A reappraisal of criteria. Part II. *Oral Surg* 1966; 22: 790-802.
- Berger JO, Nord CE. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand J Dent Res* 1973; 81: 163-6.
- Bergenholtz G, Lekholm U, Milthon R, Heden G, Ödesjö B, Engström B. Retreatment of endodontic fillings. *Scand J Dent Res* 1979; 87: 2147-24.
- Bolmström A. Susceptibility testing of anaerobes with E-test. *Clin Infect Dis* 1993; 16: suppl 4, S367-70.
- Briggs PFA, Scott BJJ. Evidence-based dentistry: endodontic failure – how should it be managed? *Br Dent J* 1997; 183: 159-64.
- Brown DF. The E-test challenged with selected strains. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 465-8.
- Cavalleri G, Cuzzolin L, Urbani G, Benoni G. Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *J Chemother* 1989; 1: 101-2.
- Chambers HF, Sande MA. Antimicrobial agents. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th ed. US, (1995) pp 1032-1141.
- Chávez de Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003; 36:500-508.
- Cheung GSP. Endodontic failures – changing the approach. *Int Dent J* 1996; 46: 131-8.
- Cheung GSP, Ho MW. Microbiol flora of root canal treated teeth with associated asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 332-7.
- Citron DM, Ostavari MI, Karlsson A, Goldstein EJC. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29, 2197-2203.

Cullmann W, Frei R, Krech T. Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. *Chemotherapy* 1993; 39(3), 169-74.

Dahlén G, Möller AJR. Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology* (1992) St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 444-75.

Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8: 375-82.

Dajani AS, Bawdon RE, Berry MC. Oral amoxicillin as prophylaxis for endocarditis: what is the optimal dose? *Clin Infect Dis* 1994; 18: 157-60.

Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P *et al.* Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *J Am Med Assoc* 1997; 277: 1794-1801.

Davis II, Richards H, Mullany P. Isolation of silver- and antibiotic-resistant *Enterobacter cloacae* from teeth. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20(3):191-4.

Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Profiling of *Propionibacterium acnes* recovered from root canal and blood during and after endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1992; 8: 248-254.

Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L Systemic diseases caused by oral microorganisms. *Endod Dent Traumatol* 1994; 10: 57-65.

Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 142-9.

De Lorenzo JL. *Microbiologia para o estudante de odontologia*. São Paulo: Editora Atheneu, 2004, p. 274.

Egan MW, Sprat Da, Ng Y-L, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canal of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J* 2002; 35: 321-329, 2002.

Engström B The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15: 87-106.

Engström B, Hard AF, Segerstad L, Ramström G, Frostell G Correlation of positive cultures with prognosis for root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15: 275-80.

Ernest MA, Conte MV, Keudell KC. Antibiotic sensitivity patterns of facultative and obligate anaerobic bacteria from pulp canals. *J Endod* 1977; 3: 106-9.

Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Möller AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 134-44.

Fass RJ. Erythromycin, clarithromycin, and azitromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2080-6.

Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005; 38: 372-380.

Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation, survival growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol and Immunol* 2003; 18, 234-9.

Finegold SM & National committee for clinical laboratory standards working group on anaerobic susceptibility testing. Susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 1253-6.

Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10th edn. St Louis, MO, USA: Mosby, (1998) 1079 p.

Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of *Enterococcus* species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(2):254.

Friedman S, Lost C, Zarrabian M, Trope M. Evaluation of success and failure after endodontic therapy using a Glass Ionomer cement sealer. *J Endod* 1995; 21: 384-90.

Friedman S, Stabholtz A Endodontic retreatment-case selection and technique. Part 1: criteria for case selection. *J Endod* 1986; 12: 28-33.

Fukushima H, Yamamoto K, Sagawa H, Leung KP, Walker CB Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *J Endod* 1990; 11: 534-8.

Gill CJ, Pallasch TJ. Clindamycin-associated pseudomembranous colitis: a potentially fatal adverse drug reaction. *J Am Dent Assoc* 1981; 102: 507-9.

Goldman M, Pearson AH Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969; 28: 897-905.

Gomes BPPA (1995) *An investigation into the root canal microflora*. Manchester, UK: University of Manchester. PhD thesis.

Gomes BPPA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994; 27: 291-298.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dentistry* 1996a; 24: 47-55.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *Int Endod J* 1996b; 29: 235-241.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of endodontic signs and symptoms with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996c; 29: 69-75.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19: 71-6.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR, Jacinto RC, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006 Aug;102(2):247-53. Epub 2006 Jun 8.

Grad HA. Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan* 1997; 90: 64-72.

Greenberg RN, James RB, Marier RL, Wood WH, Sanders CV, Kent JN. Microbiologic and antibiotic aspects of infections in the oral and maxillofacial region. *J Oral Surg* 1979; 37: 873-84.

Gutiérrez JH, Brizuela C, Villota E Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation and overfilling of the root canals: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 1999; 32: 40-8.

Haapasalo M, Ranta H, Ranta K Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontol Scand* 1983; 41: 19-22.

Hancock HH III, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 579-86.

Harn WM, Chen YHM, Yuan K, Chung CH, Huang PH Calculus like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 237-40.

Harrison JW Antibiotics not always necessary. *J Am Dent Assoc* 1999; 130: 782.

Heintz CE, Deblinger R, Oliet S Antibiotic sensitivities of enterococci isolated from treated root canals. *J Endod* 1975; 1, 373-6.

Heling I, Gorfil C, Slutzky H, Kopolovic K, Zalkind M, Slutzky-Goldber I. Endodontic failure caused by inadequate restorative procedures review and treatment recommendations. *J Prosth Dent* 2002; 87

Hepworth MJ, Friedman S Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *J Can Dent Assoc* 1997; 63: 364-371.

Hommez GMG, Coppens CRM, De Moor RJG. Periapical health related to the quality of coronal restorations and root fillings. *Int Endod J* 2002; 35: 680-689.

Hunt DA, Meyer RA Continued evolution of the microbiology of oral infections. *J Am Dent Assoc* 1983; 107: 52-4.

Hunt DE, King TJ, Fuller GE Antibiotic susceptibility isolated from oral infections. *J Oral Surg* 1978; 36: 527-9.

Imura N, Otani SM, Campos MJ, Jardim Junior EG, Zuolo ML. Bacterial penetration through temporary restorative materials in root-canal-treated teeth *in vitro*. *Int Endod J* 1997; 30(6):381-5.

Ida RD, Gutmann JL Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 199-203.

Iwu C, Macfarlane TW, Mackenzie D, Stenhouse D The microbiology of periapical granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 502-5.

Jacinto RC, Gomes BPPA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18, 285-92.

Jacobs MR, Spangler SK, Appelbaum PC Beta-lactamase production, beta-lactam sensitivity and resistance to synergy with clavulanate of 737 *Bacteroides fragilis* group organisms from thirty three US centers. *J Antimicrob Chemother* 1990; 26: 361-70.

Johnson CC Susceptibility of anaerobic bacteria to β -lactam antibiotics in the United States. *Clin Infect Dis* 1993; 16: Supp 4, S371-6.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20, 340-9.

Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *J Endod* 2005; 31(12):851-6.

Kiryu T, Hoshino E, Iwaku M. Bacteria invading periapical cementum. *J Endod* 1994; 20: 169-172.

Lage-Marques JL Análise radiográfica da qualidade do tratamento endodôntico e suas alterações. *Rev Bras Odontol* 1996; 53: 11-5.

Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 318-322.

Lewis RD, Block RM Management of endodontic failures. *Oral Surg* 1988; 66: 711-21.

Lin ML, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 11: 603-11.

Lin ML, Pascon EA, Skribner J, Gängler P, Langeland K. Factors associated with endodontic treatment failures. *J Endod* 1992; 18: 625-7.

Lomçah G, Sem BH, Çankaya H Scanning electron microscopy observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 1996; 12: 70-6.

Lopes HP, Siqueira Jr. JF, Elias CN Retratamento endodôntico. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, *Endodontia Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi, (1999) p.497-538.

Love RM. *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.

Magura ME, Abdel HK, Brown CE, Newton CW Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: an in vitro study. *J Endod* 1991; 17: 324-31.

Malooley J, Patterson SS, Kafrawy Response of periapical pathosis to endodontic treatment in monkeys. *Oral Surg* 1979; 47: 545-54.

Matusow RJ Acute-alveolar cellulitis syndrome. Part II. Clinical assesment of antibiotic effectiveness against microbes isolated from intact teeth. *Oral Surg* 1981; 52: 187-96.

Miranda VC Identificação de microrganismos resistentes ao tratamento endodôntico, com especial referência aos estreptococos. *Rev Fac Farm Odontol Araraquara* 1969; 3: 73-95.

Moening JE, Nelson CL, Kohler RB The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. *J Oral Maxillofac Surg* 1989; 47: 976-85.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.

Möller AJR *Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies*. Göteborg, Sweden (1966): Akademiförlaget.

Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Ohman A, Heyden G Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 475-84.

Molven O, Olsen I, Kerekes K Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1991; 7: 226-9.

MYERS JW, Marshall FJ, Rosen S. The incidence and identity of microorganisms present in root canals at filling following culture reversals *Oral surg Oral Med Oral Pathol* 1969; 28(6): 889-96.

Nachnani S, Scuteri A, Newman MG, Avanesian AB, Lomeli SL E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *J Periodontol* 1992; 63: 576-83.

Nair PNR Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 1987; 13: 29-39.

Nair PNR, Schoeder HE Periapical Actinomycosis. *J Endod* 1984; 10: 567-570.

Nair PNR, Sjögren U, Fidgor D, Sundqvist G Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1999; 87: 617-27.

Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990a; 16: 580-8.

Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Sundqvist G Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *J Endod* 1990b; 16: 589-95.

Nair PNR, Sjögren U, Schimacher E, Sundqvist G Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post treatment follow-up. *Int Endod J* 1993; 26: 225-33.

Nakano-Hasegawa M, Yamazaki S, Kaneda Y, Takizawa H, Maeda N, Nakamura J The formation of biofilms by microorganisms isolated from infected root canals. *J Endod* 1999; 25: abst.#PR 5.

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards – Normas de Desempenho para testes de sensibilidade antimicrobiana. (2005) 15^o suplemento informativo. M100-S15, vol 25, n 1, Table 2D, p. 55-58.

Ngui-Yen JH, Bryce EA, Porter C, Smith JA Evaluation of the E-test by using selected Gram-positive bacteria. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 2150-2.

Noda M, Komatsu H, Inoue S, Sano H. Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canals exudate of persistent apical periodontitis. *J Endod* 2000; 26: 221-4.

Nord CE Anaerobic bacteria in septicaemia and endocarditis. *Scand J Infect Dis* 1982; 31: 95-104.

Nord CE, Heimdahl A Cardiovascular infections: bacterial endocarditis of oral origin. Pathogenesis and prophylaxis. *J Clin Periodontol* 1990; 17: 494-6.

Nord CE, Wordström T Susceptibility of haemolytic oral enterococci to eight antibiotics *in vitro*. *Acta Odontol Scand* 1973; 31: 395-9.

Oishi A, Yashioka T, Kobayashi C, Suda H. Electronic detection of root canal constrictions. *J Endod* 2002; 28(5): 361-4.

Olsson-Liljequist B E-test as a routine MIC tool for reference work. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1992; 15: 479-82.

Palmer RJ, White DC Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol* 1997; 5: 435-40.

Parillo JE. Endocarditis due to resistant viridans streptococci during oral penicillin chemoprophylaxis. *N Engl J Med* 1979; 300, 296.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in Lithuanian population. *J Endod* 2000; 26: 593-5.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34: 429-434.

Peters DH, Friedel HA, McTavish D. Azitromycin – a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* 1992; 44, 750-99.

Pinheiro ET, Gomes BPPA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003a; 36(1): 1-11.

Pinheiro ET, Gomes BPPA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003b; 18(2): 100-3.

Pinheiro ET, Gomes BPPA, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canal of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2004; 37(11): 756-63.

Pitt Ford TR. The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. *Int Endod J* 1982; 15: 16-22.

Quality Assurance Guidelines. Chicago, American Association of Endodontics, (1987) pp 1-27.

Ranta K, Haapasalo M, Ranta H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Endod Dent Traumatol* 1988; 4: 269-72.

- Rasmussen BA, Bush K, Tally FP. Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clin Infect Dis* 1993; 16: supp 4, S390-400.
- Ray HA, Trope M. Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *Int Endod J* 1995; 28: 12-8.
- Reader CM, Boniface M, Bujanda-Wagner S. Refractory endodontic lesion associated with *Staphylococci aureus*. *J Endod* 1994; 20: 607-9.
- Reynaud Af Geijersstam AH, Ellington MJ, Warner M, Woodford N, Haapasalo M. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21(3):164-8.
- Reit C. Decision strategies in endodontics: on the design of a recall program. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3: 233-9.
- Roças IN, Siqueira-Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004; 30(5): 315-20.
- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9):3282-9.
- Rosan B. Os estreptococos. In: Nisengarden RJ, Newman MG. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, (1997) p. 110-25.
- Rosenblatt JE, Brook I. Clinical relevance of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 1993; 16: supp 4, S446-8.
- Rotimi V, Krousheed M, Brazier JS, Jamal WY. *Bacteroides* species highly resistant to metronidazole: an emerging clinical problem? *Clin Microbiol Infect* 1999; 5, 166-69.
- Ruddle CJ Micro-endodontic nonsurgical retreatment. *Dent Clin North Am* 1997; 41: 429-55.
- Sands T, Pynn BR, Katsikieris N. Odontogenic infections: microbiology, antibiotics and management. *Oral Health* 1995; June, 11-29.
- Sapico FL, Aldridge KE. What important problems remain in the areas of anaerobic bacteriology and anaerobic infections? *Clin Infect Dis* 1993; 16: supp 4, 451-2.
- Sapico FL, Sarma RJ. Infective endocarditis due to anaerobic and microaerophilic bacteria. *West J Med* 1982; 137: 18-23.
- Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microb Ecol Health Dis* 1993; 6: 269-75.

Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root canal therapy: a review. *Endod Dent Traumatol* 1994; 10: 105-108.

Sedgley CM, Buck G, Appelbe OK. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. *J Endod* 2006; 32(2): 104-109.

Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* .2004;19(2):95-101.

Sedgley CM, Molander A, Flanagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlén G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20:10-19.

Siqueira Jr JF. Lesões periapicais podem ser infectadas? Visão crítica do problema. *RevBras Odontol* 1997; 54: 43-6.

Siqueira Jr JF, Lopes HP. Microbiologia endodôntica. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, *Endodontia Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro: Medsi, (1999) p.185-216.

Siqueira Jr JF & Roças IN. Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96: 215-22.

Siqueira Jr JF & Roças IN. Polymerase chain reaction based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 85-94.

Siren EK, Haapasalo PP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30: 91-5.

Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990; 16: 498-504.

Sjögren U, Happonen RP, Kahnberg KE, Sundqvist G. Survival of *Arachinia propionica* in periapical tissue. *Int Endod J* 1988; 21: 277-282.

Sjögren U., Fidgor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 297-306.

Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy-a five-year retrospective study. *Int Endod J* 1993; 26: 321-33.

Stern MH, Dreizen S, Ott T, Levy BM. Analysis of positive cultures from endodontically treated teeth: a retrospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990; 69: 366-71.

- Strindberg LZ. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors: an analytical study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odontol Scand* 1956; 14: suppl 21, 1-175.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 2006; 32(2):93-8.
- Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod*. 2002; 28(4):304-10.
- Sundqvist G, Fidgor D, Sjogren U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol* 1998; 85: 86- 93.
- Sundqvist G & Reuterving CO. Isolation of *actinomyces israelii* from periapical lesion. *J Endod* 1980; 6: 602-6.
- Sundqvist G. Ecology of root canal flora. *J Endod* 1992a; 18: 427-430.
- Sundqvist G Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992b; 7: 257-62.
- Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. . *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 522-30.
- Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989; 15: 13-18.
- Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol* 2000 (2002); 28: 12-55.
- Swartz DB, Skidmore AE, Griffin JA. Twenty years of endodontic success and failure. *J Endod* 1983; 9: 198-202.
- Takahashi K Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998; 31: 311-25.
- Tani N, Tominaga N, Osada T, Watanabe K, Umemoto T. Immunobiological activities of bacteria isolated from the root canals of postendodontic teeth with persistent periapical lesions. *J Endod* 1992; 18: 58-62.
- Tomasz A Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. *N Engl J Med* 1994; 28: 1247-51.
- Torabnejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod* 1990; 16: 566-9.

Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth with refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6: 73-7.

Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extra-radicular endodontic infection. *Endod Dent Traumatol* 1987; 3: 86-90.

Trowbridge HO, Stevens BH. Microbiologic and pathologic aspects of pulpal and periapical disease. *Curr Opin Dent* 1992; 2: 85-92.

Van Nieuwenhuysen JP, Aouar M, D'Hoores W. Retreatment or radiographic monitoring in endodontics. *Int Endod J* 1994; 27: 75-81.

Van Steenberghe TJM., Van Winkelhoff AJ, Graaf FJ, Duerden BI Antibiotic Susceptibilities of black pigmented Gram-negative anaerobes. *Immunol Medical Microbiol* 1993; 6: 229-234.

Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontics infections. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20(4): 253-8.

Vigil GV, Wayman BE, Dazey SE, Fowler CB, Bradley DV Jr. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *J Endod* 1997; 23(2):110-4.

Walker (1992) Antimicrobial agents and chemotherapy. In: Slots J, Taubman MA, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 242-64.

Waltimo TMT, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MPP Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999; 32: 94-8.

Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 96-101.

Walton RE, Chiappinelli J Prophylactic penicilin: effect on posttreatment symptoms following root canal treatment of asymptomatic periapical pathosis. *J Endod* 1993; 19: 466-70.

Wasfy Mo, McMahon K, Minah GE, Falker WA Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7, 100-5.

Wayman BE, Murata SM, Almeida RJ, Fowler CB A bacteriological and histological evaluation of 58 periapical lesions. *J Endod* 1992; 18:152-55.

Wexler HM. Susceptibility testing of anaerobic bacteria--the state of the art. *Clin Infect Dis* 1993 Jun; 16 Suppl 4: S328-33.

Wexler HM, Molitoris E, Finegold SM. Effect of β -lactamase inhibitors on the activities of various β -lactam agents against anaerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35: 1219-24.

Yamamoto K, Fukushima H, Tsuchiya H, Sagawa H Antimicrobial susceptibilities of Eubacterium, Peptostreptococcus, and Bacteroides isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 1989; 15: 112-6.

Zeldore BJ, Ingle JI Management of periapical infection: antibiotic sensitivity of bacteria isolated from root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1962; 15: 721-6.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA PESQUISA CLÍNICA

VOLUNTÁRIO: _____

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pela orientadora Prof^ª. Dr^ª. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou pela aluna de mestrado Maraisa Greggio Delboni, objetivando formar acordo, por escrito, mediante o qual o indivíduo, parte integrante da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

I. TÍTULO DA PESQUISA

"Identificação de Microrganismos Presentes na Saliva, Coroa Dental e Canal Radicular de Dentes Indicados ao Retratamento Endodôntico e sua Suscetibilidade a Alguns Agentes Antimicrobianos".

II. PROPOSIÇÃO

5. Identificar *Enterococcus* spp., *Candida* spp. e enterobactérias na saliva de pacientes que possuem dentes indicados para o retratamento endodôntico.
6. Identificar *Enterococcus* spp. e *Candida* spp. e enterobactérias no material restaurador dos dentes indicados para o retratamento endodôntico.
7. Estudar a composição da microbiota dos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com imagens radiográficas sugestivas de lesões periapicais persistentes com necessidade de retratamento
8. Relacionar os achados clínicos e radiográficos com a presença de microrganismos específicos nos canais radiculares
9. Analisar a sensibilidade antimicrobiana e a produção de β -lactamase de espécies bacterianas, dos gêneros *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Prevotella* isolados dos dentes tratados endodonticamente com insucesso endodôntico.

III. JUSTIFICATIVA

Este trabalho tem o objetivo de verificar se existe uma inter-relação das bactérias da saliva, do material restaurador e dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. Iremos também investigar a suscetibilidade antimicrobiana de espécies bacterianas comumente isoladas desses canais. Será que a microinfiltração coronária é o principal fator de insucesso do tratamento endodôntico?

Um maior estudo dos fatores clínicos e das bactérias associadas ao fracasso do tratamento endodôntico poderia nos levar a uma melhoria das técnicas de combate à infecção e, conseqüentemente, elevar as taxas de sucesso do retratamento. O conhecimento do padrão de suscetibilidade antimicrobiana dessas bactérias poderia orientar, quando indicado, a correta administração do antibiótico. Este e outros questionamentos procuraremos responder neste trabalho.

Além disso, estudos sobre RETRATAMENTO ENDODÔNTICO fazem parte da linha de pesquisa do Laboratório de Microbiologia aplicada à Endodontia de nossa disciplina, que foi montado graças ao financiamento da FAPESP. Dessa maneira, o presente trabalho promoverá uma continuidade na linha de pesquisa.

II. PROCEDIMENTO DO EXPERIMENTO

Seleção dos pacientes

Serão selecionados pacientes com necessidade de retratamento endodôntico. Serão estudados 30 casos. O retratamento endodôntico será evidenciado pela constatação de uma área radiolúcida na região periapical do dente envolvido, acompanhado ou não de sinais e sintomas, indicando a persistência da lesão por um período mínimo de 2 anos após o tratamento endodôntico. Serão obtidos os dados relativos ao sexo, idade, doenças sistêmicas e uso de medicamentos. Os pacientes com doenças sistêmicas e com história de antibioticoterapia recente e uso de antifúngicos não serão incluídos no estudo.

Aspectos clínicos e radiográficos

Para cada paciente serão anotados dados pessoais, história médica e história dentária. No exame subjetivo serão anotados dados sobre a condição atual do dente a ser retratado, quanto à presença ou ausência de dor. No exame objetivo serão anotados dados tais como: a presença de edema, de fístulas, presença ou não de restaurações no dente tratado endodonticamente, cáries e fraturas. Serão realizados testes para verificar dor à percussão, à palpação e mobilidade, além da realização de sondagem periodontal.

Na análise radiográfica, será avaliada a qualidade da obturação, a presença de lesão periapical relacionada ao dente tratado endodonticamente, a presença de alguma imagem de cárie sob a restauração ou sugerindo uma infiltração coronária neste dente.

Coleta de amostras

Após a colocação do isolamento absoluto, será feita a descontaminação do campo operatório. Será executada a remoção do material restaurador com brocas esféricas diamantadas e de material obturador com brocas de Gates-Glidden e limas endodônticas, sem o uso de solventes da guta-percha. Após a abertura coronária, será coletada toda a guta-percha removida do canal radicular durante a desobturação, sempre de um único canal radicular, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico. Será feita uma radiografia para obtenção do comprimento de trabalho e para verificar a remoção do material obturador. Será feita uma irrigação do canal radicular com soro para remover qualquer resíduo remanescente do material obturador e deixar o canal úmido para a última coleta, na qual, cones de papel absorvente estéril serão introduzidos no comprimento de trabalho pré-estabelecido permanecendo nesta posição por 60 segundos. Este cone, normalmente é usado para secar o canal. A coleta de amostra é simples e faz parte do tratamento endodôntico, não existindo outro método alternativo para tal. A coleta das amostras dos canais radiculares será realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio.

Após a coleta das amostras bacteriológicas, o dente em questão será retratado e restaurado pelo mesmo operador. Além disso, será feito um acompanhamento de todos os retratamentos realizados neste experimento, durante, no mínimo, 4 anos.

No laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP, os recipientes com o material colhido da saliva, da coroa dental e do canal radicular serão processados adequadamente para que se obtenha o isolamento, cultivo e identificação dos microrganismos. Algumas espécies encontradas serão testadas quanto sua sensibilidade antimicrobiana.

V. DESCONFORTO OU RISCOS ESPERADOS

O processo é indolor. Se o paciente sentir dor, esta não será devido à coleta de amostra e sim a persistência da infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais.

Se houver dor fora dos dias marcados para o tratamento, o paciente receberá uma assistência imediata dos responsáveis pela pesquisa, assim o mesmo deverá entrar em contato através dos telefones locais descritos a seguir:

(0xx19) 3412-5215 (laboratório de Endodontia)

(0xx19) 8138-8887 (celular dos pesquisadores).

O paciente também poderá ser atendido no Plantão de Emergência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 hs e de 13:30 às 17:30 hs.

Para qualquer informação ou esclarecimento sobre o tratamento, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores através dos telefones citados acima, ou mesmo, diretamente com CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) desta Instituição, através do telefone **(0xx19) 3412-5349** ou fax da instituição **(0xx19) 3412-5218**, ou correio: caixa Postal 52, 13414-903 - Piracicaba, SP. E-mail: cep@fop.unicamp.br

O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Uma cópia deste termo (TCLE) será entregue ao voluntário, portanto o mesmo terá em mãos telefones e endereços para contacto.

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a privacidade do indivíduo quanto aos dados confidenciais que possam a ser envolvidos na pesquisa.

VI. BENEFÍCIOS DO EXPERIMENTO

A presente pesquisa visa à identificação das bactérias encontradas nos canais radiculares de dentes a serem retratados endodonticamente com presença de uma lesão periapical. Descobrir estas bactérias iremos:

- a) Investigar a composição da microbiota dos canais radiculares obturados, associados com lesões periapicais, relacionando também com a microbiota da coroa dental e saliva do paciente em questão;
- b) Analisar a suscetibilidade antimicrobiana das bactérias isoladas de casos associados ao retratamento endodôntico a diversos agentes antimicrobianos, através do teste de sensibilidade antimicrobiana (E-test).

Isto poderá ajudar a entendermos melhor os sinais e sintomas de origem endodôntica. A identificação de bactérias persistentes no canal radicular obturado poderá possibilitar a realização de um antibiograma que orientará a escolha correta de um antibiótico e/ou medicação intracanal, e se for necessário irá complementar o seu tratamento ajudando o organismo a combater a infecção.

VII. INFORMAÇÕES

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa.

Os materiais e, ou dados coletados, ficarão à disposição dos sujeitos de pesquisa, sendo preservada a identidade dos mesmos.

A pesquisa não acarretará nenhum ônus ao paciente. Se por acaso houver necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional, os gastos com este deslocamento serão ressarcidos.

VIII. RETIRADA DO CONSENTIMENTO

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo e assim do grupo de amostra, este não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

IX. CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____
certifico que tenho lido as informações acima e suficientemente esclarecido (a) de todos os itens pela Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou Maraisa Greggio Delboni, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

Piracicaba, ____ de _____ de 2005.

Nome: _____ RG: _____

Assinatura: _____

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP, endereçado a Av. Limeira, 901 – Caixa Postal 52, CEP 13414-903, na cidade de Piracicaba/SP.



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



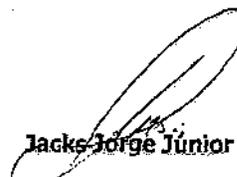
CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Identificação de Microrganismos Presentes na Saliva, Coroa Dental e Canal Radicular de Dentes Indicados ao Retratamento Endodôntico e sua Suscetibilidade a Alguns Agentes Antimicrobianos**", protocolo nº 010/2005, dos pesquisadores **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES** e **MARAISA GREGGIO DELBONI**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 22/03/2005.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**Investigation of bacteria associated with endodontic failure**", register number 010/2005, of **BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES** and **MARAISA GREGGIO DELBONI**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 22/03/2005.


Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO III – Quadro dos aspectos clínicos e radiográficos relacionados às espécies microbianas identificadas na saliva, na coroa e no canal radicular de 30 dentes com insucesso endodôntico.

N	I	S	Dente	COROA	QUA REST	QUA TRAT	T M	PINO OBT	Limite apical	Diâm lesão	F	E	D P	DPe	TEP	Saliva	Coroa	Canal radicular
1	3 8	M	11 uni	Resina pigmentada	Ruim	Ruim	6	-	1mm	6 mm	P	P	P	PV	10	<i>C.albicans, S. lentus</i>	<i>E. limosum</i>	<i>E. faecalis, E. limosum, Bifidobacterium spp., Pasteurella spp., P. acnes, P. buccae</i>
2	3 8	M	15 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Ruim	3	1mm	2 mm	2mm	A	A	A	PH	10	<i>C. albicans</i>	<i>C.albicans, S. lentus</i>	<i>Micrococcus spp., A. viscosus, S. lentus</i>
3	3 3	F	22 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Bom	5	A	1mm	+ 20mm	A	A	A	A	10	<i>E. faecalis</i>	<i>Veillonella spp., S. saliv salivarius, G. haemolysans, S. mitis1, A. viscosus</i>	<i>A. israelii, E. faecalis, A. naeslundii, G. morbilloorum, C. bifementans</i>
4	2 8	M	34 bi	Resina/ Cotosol	Boa	Bom	1	-	1mm	3mm	A	A	A	A	+ 5	-	<i>H. influenzae, S. marcescens, E. limosum, S. lentus</i>	<i>Serratia marcescens</i>
5	4 7	M	44 uni	Coroa Metálica	Boa	Bom	4	-	0mm	3mm	A	A	A	A	+ 5	<i>S. xyloso</i>	<i>S. constellatus, G. haemolysans, E. faecalis, S. xyloso</i>	<i>E. faecalis, E. limosum, M. lentus, S.xyloso</i>
6	3 8	F	22 uni	Resina/ Cotosol	Ruim	Bom	2	-	1mm	4mm	A	A	A	A	+ 5	<i>E. faecalis, S. lentus</i>	<i>S. mutans, E. faecalis, A. israelii</i>	<i>A. israelii, S. mutans</i>
7	4 2	M	22 uni	Pino/ Coroa Metálica	Boa	Ruim	2	2mm	2mm	2mm	A	A	A	P	+ 5	<i>E. cloacae</i>	<i>E. faecalis, S. mitis 1, S. lentus, G. haemolysans, S. mutans</i>	<i>E. faecalis, Candida albicans</i>
8	6 4	F	45 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Ruim	1	1mm	1mm	2mm	A	A	A	A	10	<i>S. lentus, E. agglomerans C. albicans, E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i>
9	1 7	F	12 uni	Resina	Ruim	Ruim	5	-	0mm	5mm	A	A	A	A	+ 5	<i>C. albicans</i>	<i>P. buccae, A. meyeri, G. haemolysans, S. acidominimus, Bifidobacterium spp., S. salivarius</i>	<i>Bifidobacterium spp., A. meyeri, G. haemolysans, P. buccae, C. acetobutylicum</i>
10	3 1	M	22 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Ruim	4	2mm	1mm	5mm	A	A	A	A	+ 5	<i>C. albicans, S. lentus, E. faecalis, E. cloacae, S. marcescens</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis, S. lentus, S. marcescens, S. mitis 1</i>
11	5 0	M	12 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Bom	5	A	2mm	5mm	A	A	A	A	10	<i>E. faecalis, S. xyloso, E. agglomerans, E. aerogenes, S. odorifera, C. albicans</i>	<i>S. odorifera, S. xyloso, S. marcescens</i>	<i>S. odorifera, xyloso, S. lentus, S. liquefaciens, E. aerogenes</i>
12	1 7	F	11 uni	Resina / Cárie	Ruim	Ruim	4	-	0,5mm	10mm	A	A	A	A	+ 5	<i>E. faecalis, S. lentus, C. albicans</i>	<i>A. viscosus, P. granuloso, E. limosum</i>	<i>A. meyeri, P. granuloso, A. viscosus, P. micros</i>

ANEXO III - continuação

N	I	S	Dente	COROA	QUA REST	QUA TRAT	T M	PINO OBT	Límite apical	Diâm lesão	F	E	D P	DPe	TEP	Saliva	Coroa	Canail radicular
13	6 5	M	35 uni	Amálgama	Boa	Ruim	8	-	3mm	3mm	A	A	A	A	10	<i>C. albicans</i>	<i>S. lentus</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>S. mitis</i> 1	<i>S. lentus</i> , <i>S. xyloso</i> , <i>S. mitis</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>E. limosum</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>B. adolescentis</i> 2, <i>A. odontolyticus</i>
14	5 2	F	15 uni	Pino / Coroa Metálica	Ruim	Ruim	4	2mm	4mm	+20mm	A	P	A	A	+20	<i>C. albicans</i> , <i>E. aerogenes</i>	<i>P. intermédia</i> , <i>S. mitis</i> 1, <i>C. acetobutylicum</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>G. morbillorum</i> ,	<i>G. morbillorum</i> , <i>P. prevotii</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>C. bifementans</i>
15	5 2	F	14 uni	Pino / Coroa Metálica	Boa	Ruim	2	2mm	5mm	+20mm	A	H	A	A	+20	<i>C. albicans</i> , <i>E. aerogenes</i>	<i>C. albicans</i> , <i>S. mitis</i> 1, <i>A. odontolyticus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>C. acetobutylicum</i>	<i>S. xyloso</i> , <i>P. acnes</i>
16	4 3	F	34 uni	Resina	Boa	Bom	4	-	0mm	5mm	A	A	A	A	10	<i>S. lentus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>S. lentus</i>	<i>S. lentus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. oralis</i> , <i>P. pseudomonas</i> spp.
17	3 0	M	22 uni	Resina	Ruim	Bom	1	-	0mm	+ 10 mm	P	A	A	A	4	<i>C. albicans</i>	<i>S. mitis</i> 1	<i>S. mitis</i> 1
18	1 5	F	46 tri	Resina sem pigm	Boa	Bom	5	-	0mm	3mm	A	A	A	A	5	<i>E. cloacae</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>G. morbillorum</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>S. lentus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>P. pseudomonas</i> spp.
19	5 9	M	43 uni	Resina manchada	Ruim	Ruim	2	-	5mm	3mm	A	A	A	P	10	<i>S. sciuri</i> , <i>S. lentus</i>	<i>G. morbillorum</i>	<i>G. morbillorum</i> , <i>A. viscosus</i>
20	4 3	F	22 uni	Pino metálico / Coroa	Boa	Ruim	3	1mm	3mm	3mm	A	A	A	PV	10	<i>S. lentus</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>S. mitis</i> 1	<i>S. mitis</i> 1, <i>S. mutans</i> , <i>L. lactis cremoris</i>
21	6 1	F	23 uni	Pino met Relyx / Coroa	Ruim	Ruim	9	1mm	1mm	4mm	A	A	A	P	10	-	<i>L. lactis cremoris</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>S. acidominimus</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>A. israelii</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp.,	<i>L. lactis cremoris</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. israelii</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>A. salmonicida</i>
22	3 1	F	15 uni	Pino met Relyx / Coroa	Ruim	Ruim	6	2mm	0mm	4mm	A	A	P	PVH	2	<i>S. caprae</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>S. xyloso</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. fluorescens</i>	<i>P. aeruginosa</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. acnes</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>C. tetani</i>
23	4 3	F	46 tri	Amalgama e Resina	Ruim	Bom	2	-	0mm	+20mm	P	P	P	PV	6	<i>C. albicans</i>	<i>S. acidominimus</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>S. acidominimus</i>
24	5 9	M	31 uni	Resina manchada	Ruim	Ruim	1	-	3mm	+40mm	A	P	A	PVH	+30	<i>P. mirabilis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecium</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. mirabilis</i>

ANEXO III – continuação

N	I	S	Dente	COROA	QUA REST	QUA TRAT	T M	PINO OBT	Limite apical	Diâm lesão	F	E	D P	DPe	TEP	Saliva	Coroa	Canal radicular
25	59	M	41 uni	Resina manchada	Ruim	Bom	1	-	2mm	+40mm	A	P	A	PVH	+30	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i>
26	59	M	42 uni	Resina manchada	Ruim	Bom	2	-	2mm	+40mm	A	P	A	PVH	+30	<i>E. faecium</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. acidominimus</i> , <i>S. aureus</i>
27	30	M	11 uni	Resina manchada	Ruim	Ruim	2	-	3mm	+10mm	P	A	A	A	5	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. anginosus</i>	<i>A. naeslundii</i> , <i>S. aureus</i>
28	61	F	13 uni	Pino metal	Boa	Ruim	6	A	5mm	4mm	A	A	P	A	10	-	<i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. aphrophilus</i>	<i>S. epidermidis</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. ubers</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. faecalis</i>
29	43	F	21 uni	Resina manchada	Ruim	Ruim	7	-	3mm	3mm	P	A	A	PVH	10	<i>E. faecium</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosum</i>	<i>S. mitis</i> 1, <i>G. morbillorum</i> , <i>G. haemolysans</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp.	<i>S. mitis</i> 1, <i>G. morbillorum</i> , <i>S. xylosum</i> , <i>Capnocytophaga</i> spp., <i>A. meyeri</i> , <i>S. lentus</i> , <i>S. saliv salivarius</i>
30	43	F	11 uni	Amalgama manchado	Boa	Bom	7	-	0mm	3mm	A	A	A	A	10	<i>E. faecium</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. xylosum</i>	<i>S. mitis</i> 1	<i>S. mitis</i> 1, <i>P. micros</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. sciuri</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>A. israelii</i>

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CEAR LAYERS

ANEXO IV – E-TEST

Tabela 1: Suscetibilidade antimicrobiana de *Propionibacterium acnes* e *Pepstreptococcus micros*.

Antibióticos	E-test		CIM
	P. acnes	P micros	
RI	>1.0	>256	.016 - 256
MZ	-	>256	.016 - 256
XL	>.75	>256	.016 - 256
PG	>.064	>32	.002 - 32
AZ	>.23	>.19	.016 - 256
GM	-	>256	.016 - 256
MX	>.50	>.50	.002 - 32
DC	>12	>.19	.016 - 256
CF	-	>256	.016 - 256
AC	>.25	-	.016 - 256
CL	>6	>4	.016 - 256
CM	>24	>256	.016 - 256
CI	>.25	>32	.002 - 32
EM	>.38	>.38	.016 - 256
VA	>1.5	-	.016 - 256
TC	>1.5	-	.016 - 256

Tabela 2: Suscetibilidade antimicrobiana de *Actinomyces* spp.

Antibióticos	E-TESTE						CIM
	M12E11	M10E1	M21E7	M21E11	M21C8	M22E8	
RI	>256	>256	>1.5		>.016		.016 - 256
MZ	>256	>256					.016 - 256
XL	>256	>.75	>2	>.50	>256		.016 - 256
PG	>32	>3	>3		>32		.002 - 32
AZ	>256	>8	>256		>256	>2	.016 - 256
GM	>256	>3					.016 - 256
MX	>.50	>.19	>32		>.125	>.25	.002 - 32
DC	>96	>256	>8		>.38		.016 - 256
CF	>256	>16					.016 - 256
AC	>.047		>256		>.016	>256	.016 - 256
CL	>256	>256	>256	>1.0	>.19		.016 - 256
CM	>256	>16	>32	>.19	>.032		.016 - 256
CI		>.75	>256		>.75	>1.5	.002 - 32
EM		>3	>4	>.19	>256		.016 - 256
VA			>4		>.38		.016 - 256
TC				>6	>.25		.016 - 256

ANEXO V - Meio de Transporte VMGA III

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

Preparo:

SAL AZUL – Solução estoque (100ml)

1.	Água destilada estéril.....	30mL
	Acetato de fenilmercuriocromo.....	0,05g
	Dissolver em banho-maria durante a noite a 56°C	
2.	Água destilada estéril.....	20mL
	Glicerofosfato de sódio.....	10g
	Dissolver aquecendo levemente na manta.	
3.	Água destilada estéril.....	30mL
	Cloreto de Cálcio hidratado (CaCl ₂ 6H ₂ O).....	0,16g
	Cloreto de Potássio (KCl).....	0,42g
	Cloreto de Sódio (NaCl).....	1,0g
	Sulfato de Magnésio.....	0,1g

Misturar a solução 1,2 e 3 bem dissolvidas e resfriadas em uma proveta graduada e adicionar água destilada estéril até completar o volume de 100ml. Adicionar 0,003g de Azul de Metileno. Acondicionar em geladeira.

Solução de NaOH + KOH 8M (100mL)

Pesar KOH e NaOH:

NaOH.....32g

KOH.....44,88g

Dissolver em 70mL de água destilada.

Após dissolvido acrescentar 30mL de água destilada (completa 100mL)

Autoclavar.

AUTOCLAVAR NO DIA ANTERIOR para fazer 125mL de VMGA

- papel alumínio para pesar (4) e peixinhos.
- No mínimo 125 eppendorffs com 3 bolinhas de vidro cada.
- Proveta de 25mL
- Um frasco contendo 68,75mL de água destilada.
- Um frasco contendo 37,5mL de água destilada (para a gelatina é bom esterelizar c/ os peixinhos)
- Dois frascos vazios de 250mL.
- Um frasco vazio de 500ml.
- Um frasco contendo 150mL de água destilada.
- 1,25mL de água destilada.
- 4 funis

- 4 tubos de ensaio.
- 4 espátulas
- 1 bécker pequeno.

Programar para que tudo seja preparado na parte da manhã.

Primeiramente deve-se prepara o Bacto Agar e colocar para autoclavar.

Ligar logo em seguida o banho-maria a aproximadamente 50°C.

Prepara depois, a gelatina que deve ser colocada por aproximadamente 30 segundos no microondas e depois deixar no banho-maria caso não derreta tudo.

Solução 1

Quantidade de VMGA	100mL	250mL	125mL
Água destilada estéril	550mL	137,5ml	68,75mL
Triptose (DIFCO, Detroit, EUA)	0,5g	0,125g	0,0625g
Tryptone e Peptone (BBL, Cockeyville, EUA)	0,5g	0,125g	0,0625g

Dissolver com agitação e aquecimento (microondas)

Solução 2

Quantidade total de VMGA	1000mL	250mL	125mL
Água destilada estéril	50mL	12,5mL	6,25mL
Bacto Agar 4% (DIFCO, Detroit, EUA)	2g	0,5g	0,25g

Autoclavar a 121°C por 20 minutos

Solução 3

Quantidade total de VMGA	100mL	250mL	125mL
Água destilada estéril previamente aquecida	300mL	75mL	37,5mL
Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA)	50g	12,5g	6,25g

Dissolver c/ agitação e aquecimento.

Colocar peixinho ou aquecer no microondas por 30 segundos (10+10+10) verificando a dissolução a cada 10 seg. e depois deixar no banho-maria caso não tenha dissolvido tudo.

Solução de cisterna

Quantidade total de VMGA	100mL	250mL	125mL
L-cisteína-dihidroclorito (SIGMA)	0,5g	0,125g	0,0625g
Água destilada estéril	10mL	2,5mL	1,25mL

Quantidade total de VMGA	1000mL	250mL	125mL
Ácido tioglicólico (SIGMA, St Louis, EUA)	0,5mL	0,125g	0,0625g
Solução de sal	100mL	25mL	12,5mL

Misturar as soluções 1, 2 e 3 em um frasco de 250mL, na manta.

Resfriar a 45-50°C

Adicionar 12,5 mL (p/ 125mL) da solução estoque de sais*

Adicionar o ácido tioglicólico (0,0625 mL)

Aquecer a solução por 5 minutos até que a cor azul desapareça (fica amarelo depois que ferve).

Resfriar em água morna sob fluxo de N₂.

Levar para câmara de anaerobiose.

Adicionar a solução de cisteína.

Ajustar o pH 7,2 -7,4 com uma solução de 8M NaOH + KOH, adicionar de pouco em pouco, 10 µL por vez.

Colocar 1mL da solução em cada tubo de Eppendorf e deixar levemente aberto. Permitir que os tubos que fiquem na cabine de anaerobiose por pelo menos 2 horas.

Depois de remover os tubos da cabine, feche-os firmemente.

Autoclavar em 115°C por 20 minutos.

ANEXO VI – Teste da Catalase e Oxidase

Teste da Catalase

A enzima catalase cataliza a degradação do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular ($\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$). Os organismos catalase-positivos rapidamente produzem bolhas quando expostos a uma solução contendo peróxido de hidrogênio. O teste da catalase é fundamental para a diferenciação entre muitos microrganismos gram-positivos. Por exemplo, os estafilococos são catalase-positivos, enquanto os enterococos são catalase-negativos.

Teste da Oxidase

A enzima citocromo oxidase faz parte do transporte de elétrons e do metabolismo de nitrato em algumas bactérias. Ela pode aceitar elétrons de substratos artificiais, como derivados de fenilenediamina, produzindo um produto oxidado escuro. Este teste é utilizado para a diferenciação entre grupos de bactérias gram-negativas.

ANEXO VII - Meios de cultura

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

1.1. Descrição

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

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

1.2. Preparo

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

1.3. Aparência

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

1.4. Armazenagem

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

1.5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

1.6. Incubação

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

1.7. Fórmula

Fórmula	g/L
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido	1,0
Agar no. 2	12,0
Glicose	0,4

Piruvato de sódio	1,0
HCL cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5
pH: 7,4 ± 0,2	

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5.1. Descrição

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

5.2 Preparo

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

5.3 Aparência

Amarelo claro.

5.4 Armazenagem

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

5.5 Inoculação

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

5.6 Incubação

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

5.7 Fórmula

g/L

Mistura de peptonas	15,0
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Agar no. 1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4
pH: 7,4 ± 0,2	

ANEXO VIII - Câmara de anaerobiose

A câmara de anaerobiose consiste em uma câmara de incubação, feita de resina acrílica e tem a capacidade de armazenar placas de petri de 180 x 90 mm.

O acesso à cabine feito através de portas com luvas de borracha.

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

A cabine utiliza o sistema “Anotox” e o catalisador Palladium Deoxo “D” para manter anaerobiose estrita dentro da cabine e evitar a formação de metabólitos voláteis tóxicos. Grandes sachês ficam situados em frente do ventilador para permitir máxima exposição à atmosfera e evitar qualquer condensação de água no “Anotox” e catalisador.

A função do “Anotox” é purificar a atmosfera pela remoção de ácidos gordurosos voláteis e hidrogênio sulfúrico da atmosfera.

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

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

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

A iluminação na cabine é feita por luzes fluorescentes.



Figura: Câmara de anaerobiose

ANEXO IX – Kits de identificação bacteriana (BIOMERIEUX)

1. Api 20 Strep

1.1. Descrição

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

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

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

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

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

1.2. Materiais

Um Kit contém:

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

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

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

Equipamentos laboratoriais requeridos:

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

1.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C, em condições aeróbicas ou anaeróbicas, de acordo com as melhores condições de crescimento

das amostras. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase negativa e anaeróbios facultativos.

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

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

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

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

2. Api Staph

2.1. Descrição

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

2.2 Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

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

2.3. Procedimentos para identificação

Microrganismos são cultivados em placas de ágar-sangue por 18-24 horas a 37 °C. a cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração do Gram, produção

de catalase e requerimento gasoso. Esses procedimentos permitem a identificação primária das amostras como cocos Gram-positivos, catalase positiva e aeróbios ou anaeróbios facultativos.

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

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

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

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

3. Rapid ID 32 A

3.1. Descrição

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

3.2. Materiais

Produtos adicionais que não estão incluídos no Kit:

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

Equipamentos laboratoriais requeridos:

- Estufa de incubação a 37 °C
- Refrigerador

- Bico de Busen
- Cabine ou jarra de anaerobiose

3.3. Procedimentos para identificação

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

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

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

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

4. RapID NH

5.1 Descrição:

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

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

O recipiente para teste do RapID NH contém 10 cavidades para reações (com enzimas desidratadas), que proporciona 12 “scores” para os testes, e se necessário, um décimo terceiro “score” de teste (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 relatados.

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

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

5.2 Materiais:

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

KCl.....	7,5g
CaCl 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 15 mL de reagente Innova Nitrate Reagent A (#30-9003).

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

e) Swabs estéreis.

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

5.3 Procedimentos para identificação:

Os organismos são subcultivados em placas de agar (Columbia) com 5% de sangue de cavalo por 18-24 horas a 37°C. A pureza da cultura é primariamente checada pela morfologia da colônia, coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

Um swab de algodão estéril é usado para inocular as colônias bacterianas no RapID Inoculation Fluid, até obter-se uma suspensão leitosa com turbidez equivalente ao McFarland 3 (suspensões preparadas com turbidez inferior ao McFarland 3 podem comprometer o resultado do teste). A suspensão é agitada no Vortex, devendo ser utilizada dentro de 15 minutos.

A tampa da cartela é aberta para que seja feita a inoculação bacteriana.

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

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

O segundo resultado é obtido após a adição dos reagentes.

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