



UNICAMP UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS – UNICAMP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA – FOP



ERICKA TAVARES PINHEIRO

**ESTUDO DA MICROBIOTA DE CANAIS DE DENTES
TRATADOS ENDODONTICAMENTE ASSOCIADOS
A LESÕES PERIAPICAIS E DA SUSCETIBILIDADE
DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* A DIFERENTES
ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de Título de Doutor em Clínica Odontológica, Área de Endodontia

PIRACICABA

2005

ERICKA TAVARES PINHEIRO

**ESTUDO DA MICROBIOTA DE CANAIS DE DENTES
TRATADOS ENDODONTICAMENTE ASSOCIADOS
A LESÕES PERIAPICAIS E DA SUSCETIBILIDADE
DE *ENTEROCOCCUS FAECALIS* A DIFERENTES
ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção de Título
de Doutor em Clínica Odontológica, Área de Endodontia

Orientadora:

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Profa. Dra. Márcia Pinto Alves Mayer

Prof. Dr. Antônio Olavo Cardoso Jorge

Prof. Dr. Antônio Carlos Bombana

Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho

PIRACICABA

2005

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

P655e Pinheiro, Ericka Tavares.
Estudo da microbiota de canais de dentes tratados endodonticamente assoc
lesões periapicais e da suscetibilidade de *enterococcus*
faecalis a diferentes antimicrobianos. / Ericka Tavares Pinheiro. --
Piracicaba, SP : [s.n.], 2005.

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

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

(mg/fop)

Título em inglês: Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions and the antimicrobial susceptibility to different antibiotics of *enterococcus faecalis* isolates

Palavras-chave em inglês (*Keywords*):

Área de concentração: Endodontics; Bacteria; Bacterial sensitivity tests

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes; Márcia Pinto Alves Mayer;

Antônio Olavo Cardoso Jorge; Antônio Carlos Bombana; Francisco José de Souza Filho

Data da defesa: 31/01/2005

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

*Aos meus **Amigos**, do passado e do presente, principalmente aqueles que tornaram este momento ainda mais enriquecido e prazeroso. Meus sinceros agradecimentos por todo carinho e apoio recebidos sempre. Agradeço a Deus pela vida de cada um de vocês e pelo privilégio que eu tive em conhecê-los.*

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho**, pelo apoio necessário para a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen**, coordenador do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP, pela seriedade com que conduz seu trabalho.

Ao **Prof. Dr. Roger William Fernandes Moreira**, coordenador do curso de pós-graduação em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, pelo apoio recebido.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelo exemplo profissional, pelo estímulo e atenção dispensada sempre que solicitado.

Aos membros da banca de qualificação desta tese: **Prof. Dr. Eduardo Dias de Andrade**, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia** e **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz**, pela avaliação detalhada e profunda contribuição no enriquecimento deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho**, **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz** e **Prof. Dr. Fabrício Batista Teixeira**, professores da disciplina de Endodontia da FOP/UNICAMP, pelos conhecimentos transmitidos e pela amizade recebida.

Ao **Prof. Dr. David Drucker**, professor de Microbiologia Oral, da Faculdade de Odontologia - Universidade de Manchester, UK, e **Dr. Michael Anderson**, pesquisador em Microbiologia da Faculdade de Medicina - Universidade de Manchester, UK, pelos conhecimentos transmitidos e pelo apoio recebido.

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

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

Aos amigos de pós-graduação em Endodontia, **Cícero Romão Gadê-Neto, Helena Rosa Campos Rabang, Iadasa de Quadros, Ronaldo Rogério Rodrigues, Ezilmara Rolim de Sousa, Tétis Sauáia, Adelmo Moraes Souza Filho, Egas Moniz de Aragão, Alexandre Roberto Heck, Júlio César Bento dos Santos, Douglas Giordani Cortez, Daniel Pinto de Oliveira, Fábio Roberto Dametto, Rogério de Castilho Jacinto, Morgana Eli Vianna, Neylla Teixeira Sena, Vanessa Berbet, Juliana Santos, Renata Bruzanel, José Flávio Almeida, Marcelo Menini** pelo companheirismo, colaboração e amizade.

Aos amigos **Eneida Araújo, João Eduardo e Noboru Imura** pelo carinho, apoio e amizade.

Aos demais colegas do curso de pós-graduação e da graduação da FOP/UNICAMP, em especial **Marlise Inês Klein, Ana Cláudia Braga Amoras Alves e Regina Line**, pela amizade e valiosos ensinamentos.

Aos colegas da pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade de Manchester, UK: **Marta Brzostkowska, Wolfgang Tosh, Maysson Dashashi, Ali Suleiman e May Korashi**, pelo alegre convívio, carinho e amizade.

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

Às colegas, **Maraisa Delboni e Danna Mota**, pela amizade e cooperação.

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

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

À **CAPES** pelo apoio financeiro para o programa de doutorado com estágio no exterior (PDEE) realizado na Universidade de Manchester, UK.

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

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DA LITERATURA	9
3. PROPOSIÇÃO	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
5. RESULTADOS	53
6. DISCUSSÃO	63
7. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXO I . CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	89
ANEXO II. PRINCIPAIS PUBLICAÇÕES DA AUTORA	91

RESUMO

O presente estudo teve por objetivos: identificar a microbiota de canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico, e testar, *in vitro*, a suscetibilidade de cepas de *Enterococcus faecalis* a diferentes antibióticos. Sessenta dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais persistentes foram selecionados para esse estudo. Durante o retratamento endodôntico, o material obturador foi removido e foi realizada a coleta microbiológica dos canais radiculares. Foram utilizados meios de transporte, cultura e incubação que propiciam o crescimento de bactérias anaeróbias estritas. Vinte e uma cepas de *Enterococcus faecalis* foram testadas quanto à suscetibilidade aos seguintes antimicrobianos: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, eritromicina, azitromicina, vancomicina, cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina, ciprofloxacino e moxifloxacino. As concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos agentes antimicrobianos foram determinadas pelo método do E-test. As cepas também foram testadas quanto à produção de beta-lactamase utilizando nitrocefina. Microrganismos foram isolados em 51 casos. A maioria dos canais apresentava somente 1 ou 2 espécies bacterianas. Do total de espécies bacterianas isoladas, 57,4% eram bactérias anaeróbias facultativas e 83,3% Gram-positivas. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais frequentemente isolada. Bactérias anaeróbias estritas representavam 42,6% das espécies e, entre elas, *Peptostreptococcus* spp. foram os mais isolados. Associações significantes foram encontradas entre dor ou história de dor e infecções anaeróbias e polimicrobianas ($p < 0,05$). Todas as cepas de *Enterococcus faecalis* foram sensíveis, *in vitro*, às penicilinas, entretanto as CIMs de amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico ($CIM_{90} = 0,75 \mu\text{g/ml}$) foram menores do que as de benzilpenicilina ($CIM_{90} = 3.0 \mu\text{g/ml}$). Todas as cepas também foram sensíveis a vancomicina e moxifloxacino, enquanto 95,2% foram sensíveis a cloranfenicol. Entre os isolados, 85,7% foram sensíveis a tetraciclina e doxiciclina, e 80,9% a ciprofloxacino. As CIMs de eritromicina variaram de 0,38 a $>256 \mu\text{g/ml}$, com apenas 28,5% das cepas sensíveis ($CIM \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$). Suscetibilidade limitada também foi verificada com azitromicina, que foi ativa contra somente 14,2% dos isolados. Nenhuma cepa produziu beta-lactamase. Concluímos que a microbiota dos canais de dentes tratados endodonticamente é composta por um número limitado de espécies microbianas, predominantemente Gram-positivas. Anaeróbios facultativos, especialmente *Enterococcus faecalis*, são os microrganismos mais comumente isolados, entretanto, infecções polimicrobianas e anaeróbios estritos são frequentemente encontrados em canais de dentes tratados endodonticamente com sintomatologia clínica. As cepas de *Enterococcus faecalis* foram sensíveis, *in vitro*, a amoxicilina, amoxicilina associada ao ácido clavulânico, vancomicina e moxifloxacino. A maioria dos isolados foi sensível aos antibióticos: cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina, ou ciprofloxacino. Eritromicina e azitromicina foram menos eficazes.

Palavras-Chave: endodontia, bactéria, *Enterococcus faecalis*, testes de sensibilidade bacteriana

ABSTRACT

The objectives of the present study were to identify the microbial flora within root canals of teeth with failed root canal treatment, and to test, *in vitro*, the susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolates. Sixty root-filled teeth with persisting periapical lesions were selected for this study. During nonsurgical endodontic re-treatment, the root-filling material was removed and the canals were sampled. Microbial sampling, isolation and species determination were performed using advanced microbiologic techniques for anaerobic species. Additionally, 21 *Enterococcus faecalis* isolates were tested for their antibiotic susceptibilities to benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, erythromycin, azithromycin, vancomycin, chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin and moxifloxacin. Minimal inhibitory concentrations (MICs) for the antimicrobial agents were determined using the E-test System. The strains were also tested for β -lactamase production with nitrocefin. Microorganisms were recovered from 51 teeth. In most cases, one or two strains per canal were found. Of the microbial species isolated, 57.4% were facultative anaerobic species and 83.3% Gram-positive microorganisms. *Enterococcus faecalis* was the bacterial species most frequently recovered. Obligate anaerobes accounted for 42.6% of the species and the most frequently isolated genera was *Peptostreptococcus*. Significant associations were observed between pain or history of pain and polymicrobial infections or anaerobes ($p < 0.05$). All *Enterococcus faecalis* strains were susceptible to penicillins *in vitro*, however, the MICs of amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid ($MIC_{90} = 0.75 \mu\text{g/ml}$) were lower than for benzylpenicillin ($MIC_{90} = 3.0 \mu\text{g/ml}$). All strains studied were also susceptible to vancomycin and moxifloxacin, while 95.2% were susceptible to chloramphenicol. Among the isolates, 85.7% were susceptible to tetracycline and doxycycline, and 80.9% to ciprofloxacin. The MIC of erythromycin ranged from 0.38 to $>256 \mu\text{g/ml}$; only 28.5% of the strains were susceptible ($MIC \leq 0.5 \mu\text{g/ml}$). Limited susceptibility was also observed with azithromycin which was active against only 14.2% of isolates. No strains produced β -lactamase. Therefore, it was concluded that the microbial flora in canals after failure of root canal treatment were limited to a small number of predominantly Gram-positive microbial species. Facultative anaerobes, especially *Enterococcus faecalis*, were the most commonly isolated microorganisms, however, polymicrobial infections and obligate anaerobes were frequently found in canals of symptomatic root-filled teeth. *Enterococcus faecalis* isolates were completely susceptible, *in vitro*, to amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, vancomycin, and moxifloxacin. Most isolates were susceptible to chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, or ciprofloxacin. Erythromycin and azithromycin were least effective.

Key words: endodontics, bacteria, *Enterococcus faecalis*, antimicrobial susceptibility

1. INTRODUÇÃO

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

Embora muitos fatores de ordem técnica possam estar envolvidos, as bactérias persistentes após o tratamento endodôntico que se proliferam no canal radicular, ou aquelas que contaminam o canal após o tratamento endodôntico através das infiltrações coronárias, são os principais responsáveis pelo fracasso do tratamento endodôntico (LIN *et al.*, 1991, 1992; DAHLÉN & MÖLLER, 1992; CHEUNG, 1996; SIQUEIRA & LOPES, 1999; SIQUEIRA, 2001).

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

ALLEN *et al.* (1989) e HEPWORTH & FRIEDMAN (1997), analisando o sucesso do retratamento endodôntico, encontraram uma taxa de aproximadamente 66%. Esse índice se apresenta modesto quando comparado com a alta taxa de sucesso do tratamento endodôntico - 85% a 96% (SWARTZ *et al.*, 1983; SJÖGREN *et al.*, 1990; SMITH *et al.*, 1993). O menor índice de sucesso do retratamento endodôntico pode indicar, além de dificuldades técnicas devido a fatores iatrogênicos do tratamento anterior, uma dificuldade na eliminação da microbiota do canal radicular de dentes com insucessos do tratamento endodôntico (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998).

Informações sobre a natureza das infecções dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais têm aumentado nos últimos 6 anos (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PECIULIENE *et al.*, 2000, 2001; HANCOCK *et al.*, 2001; CHEUNG & HO, 2001; ROLPH *et al.*, 2001; EGAN *et al.*, 2002; PINHEIRO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004; RÔÇAS *et al.*, 2004; ADIB *et al.* 2004; GOMES *et al. in press*). A maioria dos estudos mostra que a microbiota de canais com insucesso do tratamento endodôntico difere daquela encontrada normalmente em dentes necrosados e não tratados, tanto quantitativamente quanto qualitativamente, sendo caracterizada por um número limitado de microrganismos, com predominância de Gram-positivos. *Enterococcus faecalis* é a espécie bacteriana mais freqüentemente isolada, com prevalência variando entre 29% e 77% dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico.

Os insucessos dos tratamentos endodônticos são, em sua maioria, resultados de infecções intra-radulares e encontram-se geralmente associados a lesões periapicais crônicas. Portanto, o uso de antibióticos sistêmicos não é indicado para o tratamento desses casos. Entretanto, a utilização dos mesmos pode estar indicada na profilaxia antibiótica em casos de risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana durante o retratamento

endodôntico (ABBOTT *et al.*, 1990). Nesses casos a terapia deve ser direcionada contra os principais patógenos.

Enterococos possuem mecanismos que conferem resistência a uma variedade de antibióticos, incluindo penicilina, a droga de escolha (HOELLMAN *et al.*, 1998; SHEPARD & GILMORE, 2002). Esses microrganismos apresentam resistência intrínseca a certos antibióticos como a cefalosporina, clindamicina e aminoglicosídeos (MURRAY, 1990; MORRISON *et al.*, 1997). Além da resistência intrínseca, enterococos têm adquirido determinantes genéticos que conferem resistência a várias classes de antibióticos, incluindo tetraciclina, eritromicina, cloranfenicol, e, mais recentemente, vancomicina (MURRAY, 1990; MORRISON *et al.*, 1997; MUNDY *et al.*, 2000; SHEPARD & GILMORE, 2002).

Cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* isoladas de infecções endodônticas têm demonstrado resistência bacteriana ao regime terapêutico convencional recomendado para procedimentos odontológicos. 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. PINHEIRO *et al.* (2003) encontraram cepas de *Enterococcus faecalis* resistentes aos macrolídeos: eritromicina e azitromicina. Portanto, muitos antibióticos, tradicionalmente utilizados nas infecções odontogênicas, podem ser ineficazes contra *Enterococcus faecalis*, e informações sobre drogas alternativas se tornam necessárias.

O presente estudo teve por objetivos identificar a microbiota de canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico, e testar, *in vitro*, a suscetibilidade de cepas de *Enterococcus faecalis* a diferentes antibióticos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ETIOLOGIA DO INSUCESSO ENDODÔNTICO

O objetivo do tratamento endodôntico é a diminuição da infecção, através do preparo químico-mecânico e obturação dos canais radiculares, propiciando um ambiente favorável à manutenção da saúde periapical ou ao reparo de lesões periapicais pré-existent. Na maioria dos casos em que o tratamento endodôntico fracassa, o insucesso ocorre devido a procedimentos insatisfatórios de controle e eliminação da infecção (NAIR *et al.*, 1999). Problemas comuns que podem levar ao fracasso da terapia endodôntica incluem a falta de controle asséptico durante o tratamento, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, falhas na instrumentação, obturações inadequadas, e restaurações coronárias insatisfatórias ou ausentes após o tratamento endodôntico (CHEUNG, 1996).

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

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

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

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

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

Estudos demonstram que as bactérias e seus produtos são os principais responsáveis pelo insucesso do tratamento endodôntico (MALOOLEY *et al.*, 1979; PITT FORD, 1982; LIN *et al.*, 1991, 1992). Embora fatores não-microbianos possam afetar adversamente o prognóstico do tratamento endodôntico (NAIR *et al.*, 1990b, 1993, 1999), a literatura sugere que infecções intra-radulares persistentes ou infecções secundárias são as principais causas do insucesso endodôntico (SIQUEIRA, 2001).

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

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

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

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

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

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

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

NAIR *et al.* (1990a) detectaram a presença de bactérias e fungos nos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais que não desapareceram após o tratamento endodôntico. Os autores analisaram 9 dentes utilizando a microscopia óptica e eletrônica de transmissão, e verificaram a presença de microrganismos em 6 casos, 4 contendo bactérias e 2 contendo fungos. Os microrganismos foram detectados em deltas apicais e reabsorções radiculares, em canais laterais não obturados que apresentavam comunicação com o forame apical, e entre o material obturador e as paredes dentinárias dos canais radiculares. Os resultados sugeriram que a maioria dos dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais pode conter microrganismos persistentes, que podem desempenhar um papel significativo do fracasso do tratamento 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. GOMES *et al.* (1996b) estudaram a suscetibilidade da microbiota dos canais radiculares aos procedimentos químico-mecânicos, e relataram que a terapia endodôntica não foi capaz de eliminar completamente as bactérias do sistema de canais radiculares, apresentando algumas espécies mais resistentes ao preparo químico-mecânico do que outras, como por exemplo, *Enterococcus faecalis*, *Propionibacterium acnes*, *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

Microrganismos sobreviventes às medidas de desinfecção podem morrer ou manterem-se viáveis, dependendo da quantidade de nutrientes disponíveis e da capacidade de sobreviver em condições de carência nutricional. Os microrganismos que permaneceram viáveis somente resultarão em fracasso se tiverem acesso aos tecidos periapicais, se forem patogênicos e se estiverem em número suficiente para induzir ou perpetuar uma lesão periapical (GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1996b; LOPES *et al.*, 1999; SIQUEIRA, 2001).

Algumas bactérias têm sido relacionadas a infecções endodônticas persistentes após o preparo químico-mecânico, sendo *Enterococcus faecalis* freqüentemente isolados desses canais radiculares (BENDER & SELTZER, 1952; ENGSTRÖM, 1964; GOLDMAN & PEARSON, 1969; CAVALLERI *et al.*, 1989; GOMES *et al.*, 1996b; CHAVEZ DE PAZ, 2003). 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. Bacilos entéricos Gram-negativos, incluindo espécies de *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* (HAAPASALO *et al.*, 1983), espécies de *Pseudomonas aeruginosa* (RANTA *et al.*, 1988) e fungos (WALTIMO *et al.*, 1997) foram isolados em casos de infecções que não

responderam adequadamente aos procedimentos químico-mecânico durante o tratamento endodôntico convencional, geralmente com persistência de exsudato e dor à percussão.

Segundo SIREN *et al.* (1997), as bactérias entéricas não estão presentes comumente na microbiota de canais radiculares infectados, e podem entrar no canal radicular durante o tratamento endodôntico devido a um isolamento inadequado do campo de trabalho, a uma infiltração pelo material restaurador temporário, ou quando um canal é deixado aberto para drenagem. Com o objetivo de estudar a relação entre os procedimentos clínicos e a presença de bactérias entéricas facultativas, os autores realizaram coletas microbiológicas dos canais radiculares durante diferentes procedimentos ao longo do tratamento endodôntico. Os resultados demonstraram que *Enterococcus faecalis*, outras bactérias entéricas facultativas (*Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.) e *Pseudomonas* spp. foram encontradas mais freqüentemente em casos onde os canais radiculares não foram selados em algum ponto do tratamento endodôntico, ou em casos com grande número de sessões. *Enterococcus faecalis* foi a espécie mais freqüentemente isolada. Os autores enfatizaram a importância do controle da cadeia asséptica durante a terapia endodôntica no prognóstico do tratamento.

O insucesso do tratamento endodôntico também tem sido relacionado à ausência de um selamento coronário adequado após o tratamento endodôntico (SWARTZ *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; ALVES *et al.*, 1996).

ADIB *et al.* (2004) estudaram a microbiota de canais radiculares de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais persistentes e infiltrações coronárias. 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. 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 infiltrações coronárias 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 obtenção do sucesso endodôntico.

2.2. MICROBIOTA DE CANAIS RADICULARES DE DENTES TRATADOS ENDODONTICAMENTE ASSOCIADOS A LESÕES PERIAPICAIS PERSISTENTES

Informações sobre a natureza das infecções dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais têm aumentado nos últimos 6 anos (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PECIULIENE *et al.*, 2000, 2001; HANCOCK *et al.*, 2001; CHEUNG & HO, 2001; ROLPH *et al.*, 2001; EGAN *et al.*, 2002; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004; RÔÇAS *et al.*, 2004; ADIB *et al.* 2004). Estudos iniciais (MÖLLER, 1966; 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. Esses dados foram confirmados, posteriormente, pela maioria dos estudos da microbiota de canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico.

Vários estudos têm demonstrado que a infecção de canais radiculares com polpas necrosadas e não-tratados, caracteriza-se pela presença de uma microbiota mista e polimicrobiana, comumente em combinações de 4 a 7 espécies, predominantemente anaeróbia estrita, com um relativo equilíbrio entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium* são freqüentemente cultivadas de canais radiculares infectados (SUNDQVIST *et al.*, 1989, SUNDQVIST 1992a,b; BAUMGARTNER, 1991; BAUMGARTNER & FALKER, 1991; SATO *et al.*, 1993; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996a,b,c, 2004; SOUSA *et al.*, 2003; JACINTO *et al.*, 2003).

MÖLLER (1966), realizando um estudo microbiológico de 654 canais radiculares de dentes com polpas vitais, polpas necróticas e com tratamento endodôntico

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

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

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

GOMES *et al.* (1996a) realizaram coletas microbiológicas de 70 canais infectados, dos quais, 21 apresentavam tratamento endodôntico prévio e, em sua maioria, com presença de dor. *Propionibacterium* foi o gênero mais freqüentemente isolado nos canais com tratamento endodôntico prévio. Entretanto, espécies anaeróbias pertencentes ao

gênero *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, assim como espécies facultativas como *Streptococcus*, *Lactobacillus* e *Actinomyces*, também foram isoladas.

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

SUNDQVIST *et al.* (1998) realizaram coletas microbiológicas de 54 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com lesões periapicais visíveis radiograficamente. Todos os dentes, com exceção de 1 com obturação defeituosa, apresentavam a obturação dos canais com um padrão radiográfico razoável. A técnica do retratamento foi realizada sem o uso de solventes da guta-percha. O crescimento bacteriano

foi detectado em 24 casos, sendo caracterizado por monoinfecções de microrganismos predominantemente Gram-positivos (87% das bactérias isoladas), com proporções aproximadamente iguais de bactérias anaeróbias facultativas (58%) e estritas (42%). Os gêneros isolados foram: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium* e *Bacteroides*. *Candida* spp. foi detectada em 2 casos. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüente, isolada em 38% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias.

PECIULIENE *et al.* (2000) investigaram a ocorrência de *Enterococcus faecalis* em 25 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com periodontites apicais visíveis radiograficamente. Microrganismos foram detectados em 20 dentes, e *Enterococcus faecalis* estava presente em 70% dos casos com culturas positivas, geralmente em cultura pura ou como o principal componente da microbiota.

PECIULIENE *et al.* (2001) investigaram a ocorrência de fungos, bacilos entéricos Gram-negativos e *Enterococcus* spp. em 40 dentes tratados endodonticamente, assintomáticos, e com periodontites apicais visíveis radiograficamente. Microrganismos foram detectados em 33 dos 40 dentes. Fungos estavam presentes em 6 canais (18% das culturas positivas) e foram identificados como *Candida albicans* em todos os casos. Bacilos entéricos Gram-negativos estavam presentes em 3 casos: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. *Enterococcus* spp. estavam presentes em 21 canais (64% das culturas positivas), sendo o principal ou o único componente da microbiota em 19 casos. Todas as cepas foram identificadas como *Enterococcus faecalis*.

HANCOCK *et al.* (2001) estudaram a composição da microbiota presente em 54 dentes com insucesso do tratamento endodôntico. O crescimento bacteriano foi detectado em 34 casos. A microbiota era composta principalmente por 1 ou 2 espécies de microrganismos predominantemente Gram-positivos (80,4%). Os gêneros mais isolados foram: *Enterococcus*, *Peptostreptococcus*, *Actinomyces* e *Streptococcus*. *Candida albicans*

foi detectada em 1 caso. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüente, isolada em 30% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias.

CHEUNG & HO (2001) investigaram a microbiota de canais radiculares 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 freqüentemente isolados, especialmente os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*. *Enterococcus* spp. não foram isolados nesse estudo.

EGAN *et al.* (2002) investigaram a ocorrência de fungos em infecções endodônticas. Fungos estavam presentes em 6/60 canais radiculares. 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).

PINHEIRO *et al.* (2003) realizaram um estudo bacteriológico de 30 canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Os autores relataram que a microbiota era formada, em sua maioria, por monoinfecções, composta por bactérias anaeróbias facultativas, predominantemente Gram-positivas, representadas pelos gêneros *Enterococcus* e *Streptococcus*, e, em segundo plano, por bactérias anaeróbias estritas, em especial as do gênero *Peptostreptococcus*. Foram ainda isoladas bactérias dos gêneros *Actinomyces*, *Prevotella*, *Staphylococcus*, *Gemella*, *Fusobacterium*, *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium* e *Haemophilus*. *Candida* spp. foi isolada em 1 caso. *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüente, isolada em 45,8% dos canais radiculares que apresentavam presença de bactérias.

GOMES *et al.* (2004), realizando um estudo microbiológico de 60 canais radiculares de dentes com polpas necróticas e com tratamento endodôntico prévio associado a lesões periapicais, encontraram uma associação entre os casos de insucesso

endodôntico e espécies dos gêneros *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*.

A maioria dos estudos da microbiota de canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais tem sido realizada através da coleta microbiológica dos canais radiculares e identificação bacteriana pelo método da cultura (MÖLLER, 1966; ENGSTRÖM, 1964; MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PECIULIENE *et al.*, 2000, 2001; HANCOCK *et al.*, 2001; CHEUNG & HO, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2004). Todos esses estudos apresentaram uma determinada porcentagem de culturas negativas, refletindo a dificuldade da coleta microbiológica dos canais radiculares durante o retratamento endodôntico (SUNDQVIST *et al.*, 1998). Nesses casos, um número de células bacterianas pode ser perdido durante os procedimentos de remoção do material obturador prévio. 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 (polymerase chain reaction), para identificar bactérias dos canais radiculares de dentes com tratamento endodôntico prévio (ROLPH *et al.*, 2001; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004; RÔÇAS *et al.*, 2004; GOMES *et al. in press*). Esses métodos se baseiam na detecção do DNA das espécies bacterianas, sendo, portanto, mais sensíveis do que o método da cultura, além de poder identificar cepas de cultivo difícil ou até mesmo impossível (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004).

ROLPH *et al.* (2001) estudaram a microbiota de canais radiculares 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 refratárias revelaram espécies dos gêneros *Capnocytophaga*, *Cytophaga*,

Dialister, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Solobacterium*, *Streptococcus* e *Veillonella*. Enterococos não foram isolados nos 5 casos estudados.

SIQUEIRA & RÔÇAS (2003) investigaram a ocorrência de *Propionibacterium propionicum* e *Actinomyces radidentis* em infecções endodônticas primárias e persistentes pelo método do PCR. *P. propionicum* estava presente em 36% das amostras de infecções primárias, e 58% das amostras de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais. Por sua vez, *A. radidentis* 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 & SCHOEDER, 1984; SJÖGREN *et al.*, 1988, 1997). Segundo os autores acima citados, essas bactérias, uma vez instaladas no canal radicular, podem atingir os tecidos periapicais e sobreviver fora do canal radicular, causando infecções que só podem ser removidas cirurgicamente.

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 detectadas 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 associados 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 detectado principalmente em dentes assintomáticos.

GOMES *et al.* (*in press*) 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, *Enterococcus 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, *Enterococcus faecalis* estava presente em 2 (4%) e 41 (82%) canais, respectivamente, pela cultura e PCR. Esses resultados mostraram que *Enterococcus faecalis* está presente em canais com polpas necrosadas, porém em quantidades bem pequenas, não detectáveis pelo método da 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 nesses casos.

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

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

Enterococos, cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos, são os microrganismos mais frequentemente isolados de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. Para um microrganismo colonizar canais com tratamento endodôntico prévio, ele deve escapar aos procedimentos antimicrobianos durante o tratamento inicial, e suportar períodos de privações nutricionais no canal radicular obturado (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004). LOVE (2001) demonstrou que *Enterococcus faecalis* tem a capacidade de invadir os túbulos dentinários, podendo facilitar sua fuga aos procedimentos químico-mecânicos. Esses microrganismos também têm demonstrado resistência ao hidróxido de cálcio, medicamento comumente utilizado para desinfecção dos canais radiculares (HAAPASALO & ORSTAVIK, 1987). Além desses fatores, *Enterococcus faecalis* tem 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). Recentemente, FIGDOR *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). Essas células bacterianas foram capazes de retornar ao crescimento após a adição de nutrientes. Todos esses fatores podem contribuir para a alta prevalência desse microrganismo em dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004).

2.3. SUSCETIBILIDADE/ RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DOS ENTEROCOCOS

O uso indiscriminado dos antibióticos tem levado à seleção 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).

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

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

As condições cardíacas mais associadas à endocardite bacteriana são classificadas de acordo com a *American Heart Association*, em condições de alto risco e risco moderado. As condições cardíacas consideradas de alto risco são: válvulas cardíacas protéticas; endocardite bacteriana prévia; condutos pulmonares sistêmicos construídos cirurgicamente; e doenças cardíacas cianóticas complexas, como estados ventriculares simples, transposição de grandes artérias e tetralogia de Fallot. As de risco moderado, compreendem: a maioria das malformações cardíacas congênitas; disfunção valvular

adquirida; cardiomiopatia hipertrófica; prolapso da válvula mitral com regurgitação valvular e/ou espessamento dos folhetos valvulares. Em ambas condições, recomenda-se o regime antimicrobiano profilático para prevenção da endocardite bacteriana (DAJANI *et al.*, 1997; ANDRADE *et al.*, 1998).

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

Streptococcus viridans (estreptococos α -hemolíticos) é considerada a causa mais comum de endocardite infecciosa após certas intervenções odontológicas ou do trato respiratório superior; enquanto *Enterococcus* spp. seria a causa mais comum após intervenções do trato gastro-intestinal (DAJANI *et al.*, 1997). Entretanto, devido à alta prevalência de *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente associados a lesões periapicais crônicas (MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PECIULIENE *et al.*, 2000, 2001; HANCOCK *et al.*, 2001; PINHEIRO *et al.*, 2003), esses microrganismos têm o potencial de causar bacteremia e promover o desenvolvimento da endocardite bacteriana, em pacientes de risco, durante o retratamento endodôntico.

Estudos têm revelado um aumento surpreendente da resistência antimicrobiana de *Enterococcus* spp., especialmente os isolados de infecções hospitalares (HOELLMAN *et al.*, 1998; SHEPARD & GILMORE, 2002; UDO *et al.*, 2002; MURDOCH *et al.* 2002). Eles possuem mecanismos que conferem resistência a uma variedade de antibióticos comumente utilizados na terapêutica (MURRAY, 1990; MORRISON *et al.*, 1997; SHEPARD & GILMORE, 2002).

Enterococcus spp. apresentam uma sensibilidade reduzida à penicilina (MURRAY, 1990; MORRISON *et al.*, 1997; SHEPARD & GILMORE, 2002). Estudos

testando *E. faecalis*, *in vitro*, mostram que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da penicilina são 10 a 100 vezes maiores do que aquelas encontradas para a maioria dos *Streptococcus* spp. Embora eles sejam um pouco mais sensíveis à amoxicilina e à ampicilina, esses antibióticos têm apenas um efeito bacteriostático sobre a maioria dos *Enterococcus* spp. (SHEPARD & GILMORE, 2002). Por isso, para o tratamento de infecções enterocócicas sérias, uma terapia combinada de amoxicilina ou ampicilina associada à gentamicina é necessária para exercer ação bactericida (MORRISON *et al.*, 1997).

O grupo das penicilinas age inibindo a síntese da parede celular. O anel beta-lactâmico é a chave do modo de ação das penicilinas, pois se ligam a enzimas envolvidas no processo de síntese da parede celular, inativando-as (WALKER, 1992; FORBES *et al.*, 1998; ANDRADE 1999). Além de mecanismos intrínsecos que conferem uma menor sensibilidade aos efeitos bactericidas dos agentes beta-lactâmicos, *Enterococcus* spp. têm adquirido mecanismos adicionais que resultam em alta resistência a esses antibióticos (MORRISON *et al.*, 1997; SHEPARD & GILMORE, 2002). Esse fenômeno tem sido mais comum em isolados de *E. faecium* do que em *E. faecalis*, e se deve principalmente a alterações nas enzimas às quais o antibiótico vai se ligar (PBP5 – penicillin binding protein), diminuindo sua afinidade pelos mesmos (SHEPARD & GILMORE, 2002). Ocasionalmente, essa alta resistência se deve à produção de beta-lactamases, enzimas que têm a propriedade de destruir o anel beta-lactâmico de algumas penicilinas (MURRAY, 2000).

Resistência aos agentes antimicrobianos pode ser adquirida por uma mutação no DNA existente ou por aquisição de um novo DNA (MURRAY, 1990; MORRISON *et al.*, 1997). Enterococos têm adquirido determinantes genéticos que conferem resistência a várias classes de antibióticos, incluindo eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, e, mais recentemente, vancomicina (MURRAY, 1990; MORRISON *et al.*, 1997; MUNDY *et al.*, 2000; SHEPARD & GILMORE, 2002).

Eritromicina e azitromicina são do grupo dos macrolídeos, antibióticos bacteriostáticos, que agem inibindo a síntese protéica bacteriana através da ligação à subunidade 50S dos ribossomos. A azitromicina, devido à sua diferença estrutural, apresenta uma meia-vida plasmática biológica bastante prolongada nos tecidos, e um maior espectro de ação quando comparado à eritromicina (CHAMBERS & SANDE, 1995; ANDRADE, 1999). Resistência à eritromicina tem sido relatada entre enterococos isolados em infecções orais e sistêmicas (UDO *et al.*, 2002; SEDGLEY *et al.*, 2004). A resistência dos enterococos aos macrolídeos pode ser mediada por determinantes genéticos que codificam uma alteração capaz de diminuir a afinidade entre o sítio de ligação e o antibiótico (WALKER, 1992). FASS (1993) relatou a ocorrência de resistência cruzada entre eritromicina e azitromicina em diferentes microrganismos testados.

As tetraciclinas agem inibindo a síntese protéica bacteriana através da ligação à subunidade 30S dos ribossomos, e não ao 50S como os macrolídeos. Neste grupo estão incluídos, entre outros compostos, o cloridrato de tetraciclina, doxicilina e minociclina (ANDRADE, 1999). Estudos têm relatado a alta resistência dos *E. faecalis*, orais e não-orais, às tetraciclinas: 58% (RAMS *et al.*, 1992), 65.1% (UDO *et al.*, 2002) e 68.5% (COTTER & ADLEY, 2001). A resistência dos enterococos à tetraciclina é mediada por vários genes que levam à eliminação ativa da tetraciclina da célula bacteriana, ou à diminuição da afinidade dos ribossomos bacterianos pela tetraciclina (MURRAY, 1990; MONTGOMERY, 2000).

Vários estudos têm relatado que 20% a 42% (MURRAY, 1990; COTTER & ADLEY 2001; UDO *et al.*, 2002) das cepas de enterococos isolados de infecções sistêmicas são resistentes ao cloranfenicol. SEDGLEY *et al.* (2004) relataram que enterococos isolados da cavidade oral são apenas ocasionalmente resistente (1/11 – 9%). Os enterococos que adquirem resistência ao cloranfenicol inativam a droga através da acetilação, envolvendo uma enzima acetiltransferase específica (MURRAY, 1990;

MONTGOMERY, 2000). É importante ressaltar que devido aos efeitos adversos graves decorrentes do uso do cloranfenicol, como por exemplo a aplasia medular, seu uso deve ser reservado para o tratamento de infecções fatais ou resistentes a outros antibióticos (MOENNING *et al.*, 1989; MONTGOMERY, 2000).

Vancomicina é um antibiótico glicopeptídico utilizado em medicina apenas para o tratamento das infecções causadas por microrganismos Gram-positivos resistentes a outros agentes antimicrobianos mais comumente utilizados e menos tóxicos (MONTGOMERY, 2000). Seu uso na odontologia é extremamente limitado, por ser administrada exclusivamente em ambiente hospitalar, podendo estar indicada em 3 situações: nas infecções graves por *Staphylococcus*, em que todos os outros medicamentos falharam; na profilaxia ou tratamento da endocardite bacteriana em pacientes de alto risco que sejam alérgicos à penicilinas e incapazes de tomar medicamentos por via oral; e no tratamento da colite pseudomembranosa (ANDRADE, 1999). Estudos têm ressaltado o aparecimento de cepas de enterococos resistentes à vancomicina, especialmente cepas de *Enterococcus faecium* e, em menor frequência, cepas de *Enterococcus faecalis* (MURRAY, 2000; MALANI *et al.*, 2002). O mecanismo envolve uma alteração enzimática do local de ligação da vancomicina na parede celular (MONTGOMERY, 2000). Essas cepas resistentes à vancomicina têm aparecido como os principais patógenos de infecções hospitalares, e freqüentemente possuem determinantes que conferem resistência a múltiplas drogas, de tal forma que poucas opções terapêuticas restam para tratar essas infecções (MORRISON *et al.*, 1997; RICE, 2001; SHEPARD & GILMORE, 2002).

Moxifloxacino e ciprofloxacino são drogas do grupo das fluorquinolonas. Ciprofloxacino é altamente ativo contra bactérias Gram-negativas, entretanto é menos eficaz contra as Gram-positivas e, em geral, não é eficaz contra anaeróbios (MONTGOMERY, 2000). Moxifloxacino é uma fluorquinolona de nova geração com espectro de ação mais amplo, incluindo microrganismos anaeróbios e Gram-positivos, especialmente os resistentes a múltiplas drogas (SPECIALE *et al.*, 2002; OLIPHANT &

GREEN, 2002; ANDERSSON & MACGOWAN, 2003). Além de estudos sobre a atividade antimicrobiana, as propriedades relativas à farmacocinética e à farmacodinâmica do moxifloxacino têm sido estudadas, mostrando excelente biodisponibilidade, longa meia-vida e boa penetração tecidual dessa droga (KRASEMANN *et al.*, 2001).

Embora a emergência de cepas resistentes seja mais pronunciada em infecções hospitalares ou sistêmicas, estudos de *Enterococcus* spp. isolados de infecções endodônticas têm demonstrado o aparecimento de resistência bacteriana, principalmente ao regime terapêutico convencional utilizado em procedimentos odontológicos.

ZELDOW & INGLE (1962) estudaram a sensibilidade antimicrobiana de *Enterococcus* spp. aos antibióticos: penicilina, eritromicina, tetraciclina e cloranfenicol. Os resultados demonstraram que os *Enterococcus* spp. foram resistentes à penicilina e à tetraciclina em, respectivamente, 83% e 33% dos casos, e sensíveis à eritromicina e ao cloranfenicol.

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

MIRANDA (1969) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de espécies resistentes ao preparo químico-mecânico durante o tratamento endodôntico. 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 cepas de *Enterococcus* spp. isoladas de pacientes com periodontites apicais e pulpites. As cepas foram identificadas como *Enterococcus faecalis*, e a suscetibilidade antimicrobiana dessas espécies foi testada através do método de diluição em ágar. A concentração inibitória mínima da ampicilina (0.5 – 2.0 µg/mL) foi menor que a da benzilpenicilina (1.0 – 4.0 µg/mL) e fenoximetilpenicilina (2.0 – 8.0 µg/mL) para todas as espécies testadas. A maioria das espécies testadas foram sensíveis à eritromicina, porém havia uma grande variação no grau de suscetibilidade das bactérias a essa droga (0.5 - >128 µg/mL), com o aparecimento de espécies resistentes. A concentração inibitória mínima de drogas do grupo das lincosaminas variava entre 8 e >128 µg/mL, sendo portanto, *Enterococcus* altamente resistentes às lincosaminas. Os autores concluíram que a ampicilina foi mais efetiva do que a penicilina contra o *Enterococcus faecalis*, e que a eritromicina e a lincosamina apresentavam um uso limitado devido à presença de espécies resistentes.

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

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. Neste estudo, o gênero *Streptococcus* foi o mais predominante, e o *Enterococcus* o mais resistente. Dentre as espécies de *Enterococcus*, 59,7% foram resistentes à clindamicina, 21,5% resistentes à penicilina e à ampicilina, enquanto nenhuma resistência foi apresentada à eritromicina.

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 cepas de *Enterococcus* spp., 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.

DAHLÉN *et al.* (2000) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de 29 enterococos isolados após o uso de hidróxido de cálcio em canais radiculares. Todas as cepas foram sensíveis à vancomicina e à eritromicina, e resistentes ao metronidazol. A maioria das cepas (25) apresentou resistência à clindamicina. Os autores também encontraram cepas de enterococos resistentes à benzilpenicilina, à ampicilina e à tetraciclina.

NODA *et al.* (2000) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de exsudatos intra-canais, em casos de infecções endodônticas persistentes, aos seguintes antibióticos: penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos e tetraciclina. As espécies mais frequentemente isoladas pertenciam ao gênero *Streptococcus* e *Enterococcus*. Cepas de *Enterococcus* spp. foram altamente resistentes aos antibióticos testados, especialmente às cefalosporinas, à gentamicina e à tetraciclina.

PINHEIRO *et al.* (2003) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de 10 cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de 30 canais com insucesso endodôntico, e

encontraram que as cepas estudadas foram sensíveis à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. Entretanto resistência bacteriana foi verificada aos antibióticos eritromicina e azitromicina. Devido à resistência intrínseca dos enterococos à clindamicina, os autores concluíram que os antibióticos, tradicionalmente utilizados na odontologia como regimes alternativos aos pacientes alérgicos a penicilinas, parecem ser de limitado valor contra enterococos. Devido à predominância de *E. faecalis* em dentes com insucesso do tratamento endodôntico, drogas alternativas devem ser consideradas para profilaxia, em casos de risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana, durante o retratamento endodôntico.

3. PROPOSIÇÃO

1. Estudar a composição da microbiota dos canais radiculares de dentes tratados endodonticamente com imagens radiográficas sugestivas de lesões periapicais persistentes com necessidade de retratamento endodôntico

2. Analisar a sensibilidade de cepas de *Enterococcus faecalis*, isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico, a diferentes agentes antimicrobianos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

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

4.1.1 *Pacientes*

4.1.1.1 Seleção dos casos

Foram selecionados pacientes que apresentavam dentes com necessidade de retratamento endodôntico. Todos os dentes incluídos no estudo apresentavam canais radiculares com obturação prévia e imagens radiográficas sugestivas de lesões periapicais. O insucesso do tratamento endodôntico foi determinado baseado em exame clínico e radiográfico. Os dentes estudados apresentavam um tempo de tratamento endodôntico igual ou superior a 4 anos, ou a presença de sinais e/ou sintomas clínicos.

Foram obtidos os dados relativos ao sexo, idade, doenças sistêmicas e uso de medicamentos. Os pacientes com doenças sistêmicas e com história de antibioticoterapia inferior a 3 meses não foram incluídos no estudo. Também não foram incluídos os dentes nos quais substâncias químicas foram utilizadas para auxiliar a remoção da guta-percha durante o retratamento endodôntico.

Sessenta dentes, de 50 pacientes, foram incluídos nesse estudo. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, e os pacientes assinaram um termo de consentimento elaborado de acordo com as normas desse Comitê.

4.1.1.2 Aspectos clínicos e radiográficos

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

Na análise radiográfica, a obturação endodôntica foi classificada como boa quando radiograficamente não se observavam áreas radiolúcidas na obturação ou entre o material obturador e a parede do canal, e o material obturador se encontrava a uma distância de até 2 mm do ápice radiográfico. Se um ou mais desses critérios não fossem atingidos, a obturação era considerada ruim.

4.1.2. Coleta de amostras

O método utilizado neste estudo já foi descrito previamente em detalhe por GOMES (1995) e GOMES *et al.* (1994; 1996a,b,c, 2004). Os seguintes princípios foram observados ao coletar as amostras dos canais radiculares:

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

Após a colocação do isolamento absoluto, a descontaminação do campo operatório (dente, grampo, lençol de borracha e arco) foi feita com a solução de hipoclorito de sódio a 5,25 %. Para evitar a contaminação química do canal radicular com essa solução e a interferência com a cultura microbiológica, realizou-se a neutralização do hipoclorito com o tiosulfato de sódio a 5% (MÖLLER, 1966). Uma coleta microbiológica do campo operatório foi realizada para checar a eficácia do processo de descontaminação. A seguir, realizou-se a abertura coronária, e, em cada caso, foi coletada amostra de um único canal radicular, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico. Assim, em casos de dentes multirradiculares, o primeiro critério era a presença de lesão periapical associada ao canal a ser coletado, em caso de presença de lesão periapical em todas as raízes, escolhia-se o canal mais amplo.

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

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

4.1.3. Inoculação e Incubação

No laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP, dentro da cabine de anaerobiose (DON WHITLEY SCIENTIFIC, Bradford, Inglaterra), o tubo de Eppendorf contendo VMGA III e o cone de papel absorvente foi agitado (Agitador MA 162-MARCONI, São Paulo, SP, Brasil) por 60 segundos. A seguir, foram realizadas diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1.000 e 1/10.000 utilizando “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB - Lab M, Bury, Inglaterra) (Fig. 4.1C e 4.1D), e foram inoculados 50 µL de cada diluição, assim como da amostra não diluída, em placas pré-reduzidas contendo “Fastidious Anaerobe Agar” (FAA - Lab M, Bury, Inglaterra) + 5% de sangue de carneiro e FAA + 5% de sangue de carneiro + suplementos seletivos para anaeróbios (Fig. 4.1E), as quais foram incubadas em uma cabine de anaerobiose (Fig. 4.1F), a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento mais lento.

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

- Placas de FAA + 5% de sangue de carneiro, 37 ° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias.
- Placas de FAA + 5% de sangue de carneiro + ácido nalidíxico (0,01 mg/mL) (Lab M, Bury, UK), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-positivos e actinomicetos.
- Placas de FAA + 5% de sangue de carneiro + ácido nalidíxico (0,01 mg/mL) + vancomicina (0,0025 mg/mL) (Lab M, Bury, UK), 37 ° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar anaeróbios Gram-negativos.
- Placas de FAA + 5% de sangue de carneiro + neomicina (0,075 mg/mL) (Lab M, Bury, UK), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias para selecionar clostrídios e outros anaeróbios.

As mesmas diluições foram inoculadas em placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + BHI (Brain Heart Difusion) (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) para permitir o crescimento de anaeróbios facultativos e aeróbios, e em placas contendo Ágar Dextrose Sabouraud (Oxoid, Hampshire, Inglaterra) suplementado com 100 µg/ mL de cloranfenicol (Medley, Campinas, SP, Brasil) para fungos, ambos incubados aerobicamente, a 37° C, por 2 dias.

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

4.1.4 *Isolamento e identificação microbiana*

As placas com crescimento bacteriano foram examinadas em lupa estereoscópica (LAMBDA LET 2, ATTO INSTRUMENTS CO., Hong Kong) em aumento de 3 vezes, e as colônias foram diferenciadas de acordo com as suas características macroscópicas na placa (Fig. 4.2A), observando tamanho, cor, forma, textura, elevação, opacidade e hemólise. As colônias bacterianas foram isoladas em 2 placas contendo 5% de sangue de carneiro + FAA, e testadas quanto ao seu requerimento gasoso, colocando uma placa na estufa de O₂ e uma na câmara de anaerobiose, e observando em qual condição gasosa houve o crescimento bacteriano. As culturas puras (Fig. 4.2B), após serem testadas quanto ao requerimento gasoso (Fig. 4.2C), foram coradas pelo método do Gram (Fig. 4.2D) e testadas quanto à produção de catalase (Fig. 4.2E). Os seguintes métodos de identificação padronizados foram utilizados para a especificação primária dos organismos isolados:

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

4.1.5 Análise estatística

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

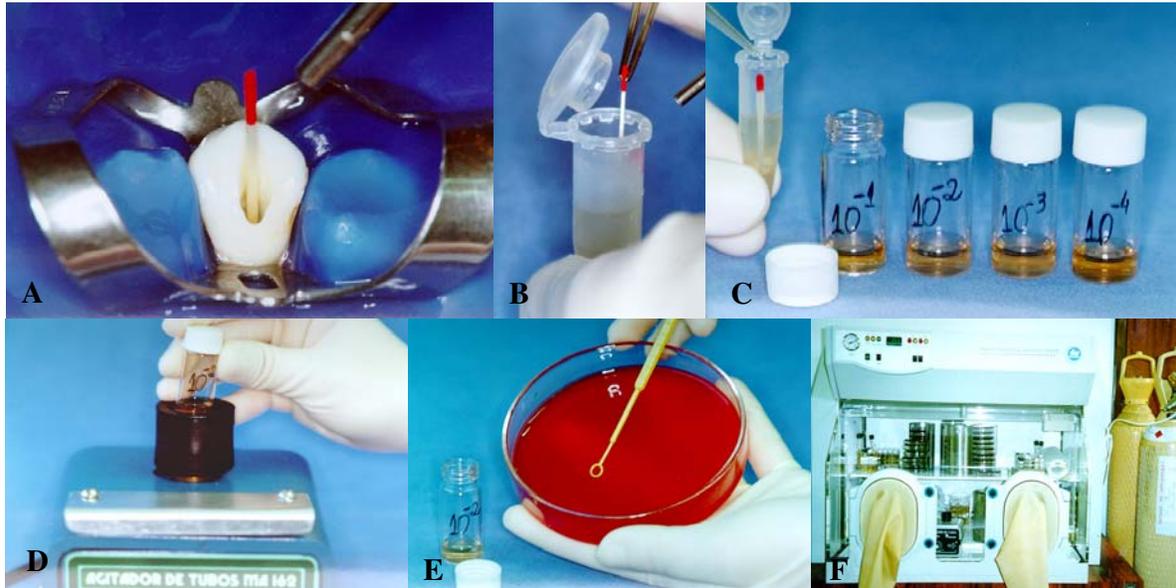


Figura 4.1. A- Coleta microbiológica do canal radicular sob fluxo de nitrogênio , B- Meio de transporte VMGA III, C- Diluição, D- Agitador de tubos, E- Inoculação, F- Incubação na câmara de anaerobiose.

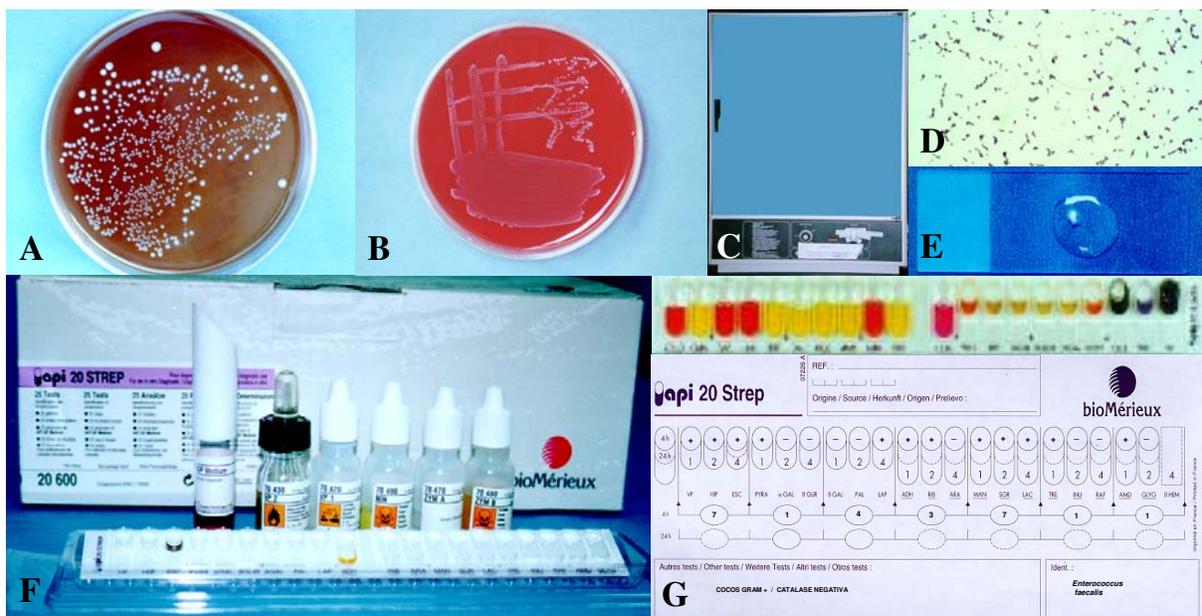


Figura 4.2. A- Primeira cultura (monoinfecção), B- Cultura pura de *E. faecalis*, C- Estufa de O₂, D- Morfologia microscópica, E- Teste da catalase, F- Kit de identificação api 20 Strep, G- Especificação bacteriana de uma cepa de *E. faecalis*.

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

Vinte e uma cepas de *Enterococcus faecalis* foram testadas quanto sua suscetibilidade/resistência através do método do E-test (AB BIODISK, Solna, Suécia). Os agentes antimicrobianos testados foram: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, eritromicina, azitromicina, vancomicina, cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina, ciprofloxacino e moxifloxacino.

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

Para preparar o inóculo, após 24 h de incubação da espécie bacteriana em placas de ágar sangue (Fig. 4.3A), as colônias bacterianas foram transferidas para o meio líquido “Brain Heart Infusion” (BHI) e agitadas (Fig. 4.3B), para atingir a turbidez que equivale ao padrão 0,5 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil) que foi verificado no espectrofotômetro (FEMTO 432, MARCONI, São Paulo, SP, Brasil) (Fig. 4.3C) com comprimento de onda de 800 nm.

Placas contendo 4 mm de espessura de 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 (Fig. 4.3D). Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test (Fig. 4.3E), 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 (Fig. 4.3F), e a leitura realizada após 16-20 horas (Fig. 4.3G). Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test, considerando o ponto de inibição completa de crescimento (Fig. 4.4A e B). De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada segundo o guia de interpretação da NCCLS (M100 S12). Para o antibiótico moxifloxacino, que não está incluído na tabela do NCCLS, a interpretação dos valores das CIMs desse antiótico foi baseada nos dados de MATHER *et al.* (2002) (Tabela 4.1).

As cepas também foram testadas quanto à produção de beta-lactamase utilizando nitrocefim (OXOID, Hampshire, Inglaterra) (Fig. 4.3H) de acordo com as instruções do fabricante. Após 24 h de incubação da cepa bacteriana em placas de ágar sangue, uma colônia bacteriana foi transferida para um recipiente contendo 5 µl da solução de nitrocefim. O desenvolvimento de uma cor vermelha em 60 s indicava um resultado positivo (Fig. 4.3I).

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

Agentes antimicrobianos	Suscetível	Resistente
Benzilpenicilina	≤ 8	≥ 16
Amoxicilina	≤ 8	≥ 16
Amoxicilina + ácido clavulânico	≤ 8	≥ 16
Eritromicina	$\leq 0,5$	≥ 8
Azitromicina	≤ 2	≥ 8
Vancomicina	≤ 4	≥ 32
Cloranfenicol	≤ 8	≥ 32
Tetraciclina	≤ 4	≥ 16
Doxiciclina	≤ 4	≥ 16
Ciprofloxacino	≤ 1	≥ 4
Moxifloxacino	≤ 2	≥ 8

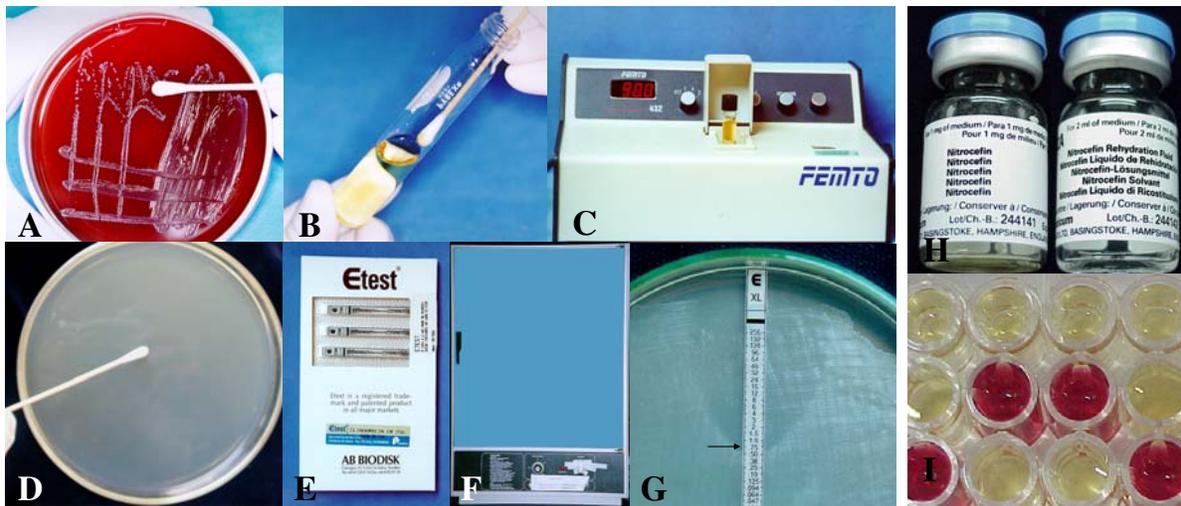


Figura 4.3. A- Cultura pura de *E. faecalis*, B- Preparo do inóculo bacteriano, C- Verificação da turbidez do meio no espectrofotômetro, D- Inoculação, E- E-test, F – Incubação em estufa de O₂, G- Halo de inibição em forma de elipse, H-Nitrocefina, I-Beta-lactamase positiva (vermelho) e negativa (amarelo).

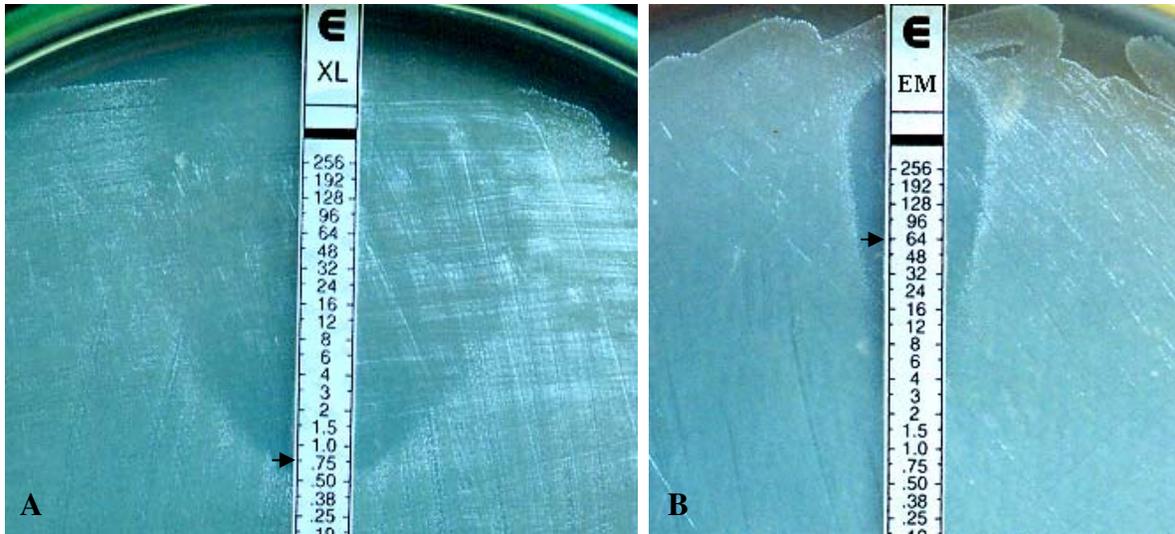


Figura 4.4. Halos de inibição em forma de elipse: A- cepa de *E. faecalis* sensível à amoxicilina + ácido clavulânico (XL) com CIM = 0,75 µg/mL, B- cepa de *E. faecalis* resistente à eritromicina (EM) com CIM = 64 µg/mL.

5. RESULTADOS

Cento e oito cepas foram isoladas dos 60 canais radiculares estudados. As espécies microbianas isoladas e sua prevalência são mostradas na Tabela 5.1. Dos 60 casos, 9 (15%) canais não apresentaram bactérias cultiváveis; 28 (46,7%) canais abrigavam apenas 1 espécie bacteriana por canal radicular; 8 (13,3%) apresentavam 2 espécies; e 15 (25%) apresentavam 3 ou mais cepas por canal radicular. As características clínicas e radiográficas e os achados microbiológicos dos 60 dentes estudados são apresentados na Tabela 5.2.

Bactérias anaeróbias facultativas e estritas representavam, respectivamente, 57,4% e 42,6% do total de bactérias isoladas. Os canais radiculares apresentavam uma microbiota predominantemente Gram-positiva, representando 83,3% do total de bactérias.

Os gêneros bacterianos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares foram: *Enterococcus* (46,7%), *Streptococcus* (28,3%), *Peptostreptococcus* (16,7%), *Actinomyces* (15%), *Prevotella* (11,7%), *Propionibacterium* (8,3%), *Gemella* (6,7%), *Veillonella* (6,7%), *Fusobacterium* (5%), *Lactobacillus* (3,3%) e *Staphylococcus* (3,3%). Espécies pertencentes a outros gêneros bacterianos foram isoladas dos canais radiculares apenas uma vez (Fig. 5.1). A espécie bacteriana mais comumente isolada foi o *Enterococcus faecalis*, presentes em 27 (52,9%) dos 51 casos que apresentaram crescimento bacteriano, 18 vezes em cultura pura.

As seguintes características clínicas estavam presentes nos casos estudados: dor (5/60), história de dor (20/60), dor à percussão (20/60), fistula (5/60), edema (1/60) e canal com exsudato (5/60). Casos de retratamento com dor ou história de dor estavam associados a infecções anaeróbias e polimicrobianas ($p < 0,05$), incluindo *Prevotella* spp. (especialmente *P. intermedia/nigrescens*) e *Fusobacterium* spp. ($p < 0,05$). Dor espontânea estava associada à presença de *Peptostreptococcus* spp. ($p < 0,01$), e dor à percussão à presença de *Prevotella intermedia/nigrescens* ($p < 0,05$). Casos com fistula estavam associados à presença de *Streptococcus* spp. ($p < 0,001$) e *Actinomyces* spp. ($p < 0,01$),

especialmente *A. naeslundii* ($p < 0,001$). Dentes com ausência de selamento coronário estavam associados à presença de *Streptococcus* spp. ($p < 0,01$) e *Candida* spp. ($p < 0,01$).

Quanto às características radiográficas, embora o limite e a qualidade da obturação endodôntica não tenham mostrado associação com espécies bacterianas específicas, os resultados estatísticos revelaram correlação entre obturações de má qualidade e a presença de três ou mais espécies bacterianas no canal radicular ($p < 0,05$).

Vinte e uma cepas de *Enterococcus faecalis*, a espécie mais frequentemente isolada, foram testadas quanto a suscetibilidade antimicrobiana. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) dos antibióticos e a suscetibilidade das cepas testadas são mostrados na Tabela 5.3. Todas as cepas de *Enterococcus faecalis* foram sensíveis a benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico, com estes últimos apresentando CIMs menores quando comparados à benzilpenicilina. Nenhuma cepa produziu beta-lactamase. Todas as cepas foram sensíveis a vancomicina e moxifloxacino, que foi o antibiótico mais efetivo, *in vitro*, contra *Enterococcus faecalis*, apresentando as menores CIMs ($\leq 0.5 \mu\text{g/ml}$). Entretanto, 8 cepas foram resistentes a azitromicina, duas das quais também foram resistentes a eritromicina. Três cepas foram resistentes a tetraciclina e doxiciclina, e 1 amostra foi resistente a vários antibióticos: eritromicina, azitromicina, tetraciclina, doxiciclina e cloranfenicol.

Tabela 5.1. Microrganismos isolados de 60 canais radiculares após a remoção do material obturador durante retratamento endodôntico.

Espécies microbianas	Nº de canais	% de canais
<i>Enterococcus faecalis</i>	27	45
<i>Enterococcus faecium</i>	1	1.7
<i>Streptococcus constellatus</i>	5	8.3
<i>Streptococcus sanguis</i>	4	6.7
<i>Streptococcus mitis</i>	2	3.3
<i>Streptococcus anginosus</i>	2	3.3
<i>Streptococcus mutans</i>	1	1.7
<i>Streptococcus oralis</i>	1	1.7
<i>Streptococcus salivarius</i>	2	3.3
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	6	10.0
<i>Peptostreptococcus micros</i>	5	8.3
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	1	1.7
<i>Peptostreptococcus saccharolyticus</i>	1	1.7
<i>Actinomyces naeslundii</i>	4	6.7
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	3	5
<i>Actinomyces viscosus</i>	3	5
<i>Prevotella buccae</i>	3	5
<i>Prevotella intermedia/ nigrescens</i>	3	5
<i>Prevotella melaninogenica</i>	1	1.7
<i>Prevotella corporis</i>	2	3.3
<i>Prevotella loescheii</i>	1	1.7
<i>Propionibacterium acnes</i>	4	6.7
<i>Propionibacterium propionicum</i>	1	1.7
<i>Gemella morbillorum</i>	4	6.7
<i>Veillonella</i> spp.	4	6.7
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1	1.7
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	1	1.7
<i>Fusobacterium</i> spp.	1	1.7
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	3.3
<i>Staphylococcus lentus</i>	2	3.3
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	1	1.7
<i>Eubacterium lentum</i>	1	1.7
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1	1.7
<i>Clostridium subterminale</i>	1	1.7
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	1	1.7
<i>Capnocytophaga</i> spp.	1	1.7
<i>Candida</i> spp.	2	3.3

Tabela 5.2. Características clínicas, radiográficas e achados microbiológicos de 60 dentes com insucesso endodôntico.

Cas on.	Dente	Tempo	Rest.	Dor	HDor	Perc.	Ede.	LP	Ex.	Fis.	TE	Bactérias
1	22	>4	N	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>S. sanguis</i>
2	41	>4	MRP	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>S. sanguis</i>
3	32	12	MRP	N	N	N	N	S	N	N	EB	-
4	12	20	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>S. salivarius</i>
5	22	2	MRP	N	N	N	N	S	S	S	ER	<i>S. mitis,</i> <i>E. faecalis,</i> <i>A. naeslundii</i>
6	15	8	RB	S	S	S	N	S	S	N	ER	<i>P. micros,</i> <i>P. prevotii</i>
7	14	>4	MRP	N	N	N	N	S	N	N	EB	-
8	11	>4	N	S	S	S	N	S	N	N	EB	<i>P. saccharolyticus</i>
9	46	>4	RB	N	N	N	N	S	S	N	ER	<i>Propioni. acnes,</i> <i>E. faecalis</i>
10	22	>4	MRP	N	N	N	N	S	N	N	ER	-
11	45	5	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	-
12	11	>4	RB	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>P. buccae,</i> <i>P. micros,</i> <i>L. acidophilus,</i> <i>E. faecalis</i>
13	21	9	N	S	S	S	N	S	S	N	ER	<i>P. intermedia,</i> <i>P. melaninogenica,</i> <i>P. corporis,</i> <i>F. necrophorum,</i> <i>P. prevotii,</i> <i>P. magnus,</i> <i>S. constellatus,</i> <i>E. faecalis,</i> <i>S. lentus</i>
14	45	>4	N	S	S	S	N	S	S	N	EB	<i>Veillonella ssp,</i> <i>S. mutans,</i> <i>L. acidophilus,</i> <i>Candida spp.</i>
15	31	15	RR	N	N	N	N	S	N	N	EB	-

Tempo= tempo após tratamento endodôntico (anos); Rest.= restauração; RB= restauração boa; RR= restauração ruim; MRP= material restaurador provisório; HDor= história de dor prévia; Perc.= dor à percussão; Ede= edema; LP= lesão periapical; Ex.= exsudato; Fis.= fístula; TE= tratamento endodôntico (qualidade radiográfica da obturação); EB= endodontia boa; ER= endodontia ruim; S= sim; N= não.

Tabela 5.2. Características clínicas, radiográficas e achados microbiológicos de 60 dentes com insucesso endodôntico (Cont.)

Cas on.	Dente	Tempo	Rest.	Dor	HDor	Perc.	Ede.	LP	Ex.	Fis.	TE	Bactérias
16	22	2	RB	N	N	S	N	S	N	N	ER	<i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>G. morbillorum</i>
17	44	5	RB	S	S	S	S	S	N	N	EB	-
18	13	10	RR	N	S	S	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
19	46	2	N	N	S	S	N	S	S	N	ER	<i>P. buccae</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>A. naeslundii</i>
20	12	5	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
21	12	20	RR	N	S	N	N	S	N	S	ER	<i>Fusobacterium</i> ssp, <i>S. oralis</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>G. morbillorum</i>
22	12	2	MRP	N	N	S	N	S	N	N	ER	<i>Veillonella</i> ssp, <i>P. prevotii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>H. aphrophilus</i>
23	37	20	RR	N	N	S	N	S	N	N	EB	<i>E. faecalis</i>
24	32	5	RB	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>P. prevotii</i>
25	22	5	RR	N	S	S	N	S	N	N	EB	<i>E. faecalis</i>
26	12	10	RR	N	S	S	N	S	N	S	ER	<i>P. prevotii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. sanguis</i>
27	21	10	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
28	15	>4	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>S. constellatus</i>
29	11	10	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
30	22	10	RR	N	N	N	N	S	N	N	EB	-

Tempo= tempo após tratamento endodôntico (anos); Rest.= restauração; RB= restauração boa; RR= restauração ruim; MRP= material restaurador provisório; HDor= história de dor prévia; Perc.= dor à percussão; Ede= edema; LP= lesão periapical; Ex.= exsudato; Fis.= fístula; TE= tratamento endodôntico (qualidade radiográfica da obturação); EB= endodontia boa; ER= endodontia ruim; S= sim; N= não.

Tabela 5.2. Características clínicas, radiográficas e achados microbiológicos de 60 dentes com insucesso endodôntico (Cont.)

Cas on.	Dente	Tempo	Rest.	Dor	HDor	Perc.	Ede.	LP	Ex.	Fis.	TE	Bactérias
31	21	5	N	N	S	S	N	S	N	S	EB	<i>S. constellatus</i>
32	46	7	N	N	N	S	N	S	N	N	ER	<i>Propioni. acnes,</i> <i>S. constellatus,</i> <i>Streptococcus</i> ssp.
33	46	>4	MRP	S	S	S	N	S	N	N	ER	<i>P. intermedia,</i> <i>P. micros,</i> <i>Bifidobacterium</i> ssp, <i>A. naeslundii,</i> <i>Streptococcus</i> ssp.
34	45	7	MRP	N	S	N	N	S	N	N	EB	<i>P. buccae,</i> <i>P. micros,</i> <i>P. prevotii,</i> <i>F. nucleatum,</i> <i>E. faecalis</i>
35	37	5	RR	N	S	S	N	S	N	N	EB	<i>E. faecalis</i>
36	11	8	RR	N	N	N	N	S	N	N	EB	<i>Veillonella</i> ssp., <i>A. odontolyticus,</i> <i>A. viscosus,</i> <i>G. morbillorum</i>
37	35	>4	RB	N	N	S	N	S	N	N	ER	<i>A. viscosus</i>
38	22	6	N	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>Propioni. propionicum,</i> <i>Veillonella</i> ssp., <i>A. naeslundii,</i> <i>E. faecalis,</i> <i>Candida</i> spp.
39	11	8	N	N	S	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
40	33	30	RR	N	N	N	N	S	N	N	EB	-
41	21	12	MRP	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
42	23	5	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
43	45	5	N	N	S	N	N	S	N	N	EB	<i>S. anginosus,</i> <i>Capnocytophaga</i> spp.

Tempo= tempo após tratamento endodôntico (anos); Rest.= restauração; RB= restauração boa; RR= restauração ruim; MRP= material restaurador provisório; HDor= história de dor prévia; Perc.= dor à percussão; Ede= edema; LP= lesão periapical; Ex.= exsudato; Fis.= fístula; TE= tratamento endodôntico (qualidade radiográfica da obturação); EB= endodontia boa; ER= endodontia ruim; S= sim; N= não.

Tabela 5.2. Características clínicas, radiográficas e achados microbiológicos de 60 dentes com insucesso endodôntico (Cont.)

Caso no.	Dente	Tempo	Rest.	Dor	HDor	Perc.	Ede.	LP	Ex.	Fis.	TE	Bactérias
44	32	30	RR	N	N	N	N	S	N	N	EB	<i>E. faecalis</i>
45	42	30	RR	N	N	N	N	S	N	N	EB	<i>E. faecalis</i>
46	37	4	RR	N	S	S	N	S	N	N	EB	<i>P. intermedia,</i> <i>E. faecalis</i>
47	21	5	MRP	N	S	N	N	S	N	N	EB	<i>E. faecalis,</i> <i>Lact. lactis cremoris</i>
48	34	12	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
49	22	5	RB	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
50	12	15	RB	N	S	S	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
51	21	11	RB	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
52	11	11	RB	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. faecalis</i>
53	14	11	N	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>A. odontolyticus,</i> <i>S. salivarius</i>
54	46	>4	RB	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>P. corporis,</i> <i>P. micros,</i> <i>Propioni. acnes</i>
55	47	>4	RB	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>E. lentum,</i> <i>S. sanguis</i>
56	24	3	N	N	N	S	N	S	N	N	EB	<i>E. faecalis</i>
57	12	6	RB	N	N	N	N	S	N	N	EB	<i>Propioni. acnes</i>
58	45	5	N	N	N	N	N	S	N	N	EB	<i>S. constellatus,</i> <i>E. faecium</i>
59	41	8	RR	N	N	N	N	S	N	N	ER	<i>C. subterminale</i>
60	46	2	RB	N	S	S	N	S	N	N	ER	-
Total				5	20	20	1	60	6	5		

Tempo= tempo após tratamento endodôntico (anos); Rest.= restauração; RB= restauração boa; RR= restauração ruim; MRP= material restaurador provisório; HDor= história de dor prévia; Perc.= dor à percussão; Ede= edema; LP= lesão periapical; Ex.= exsudato; Fis.= fístula; TE= tratamento endodôntico (qualidade radiográfica da obturação); EB= endodontia boa; ER= endodontia ruim; S= sim; N= não.

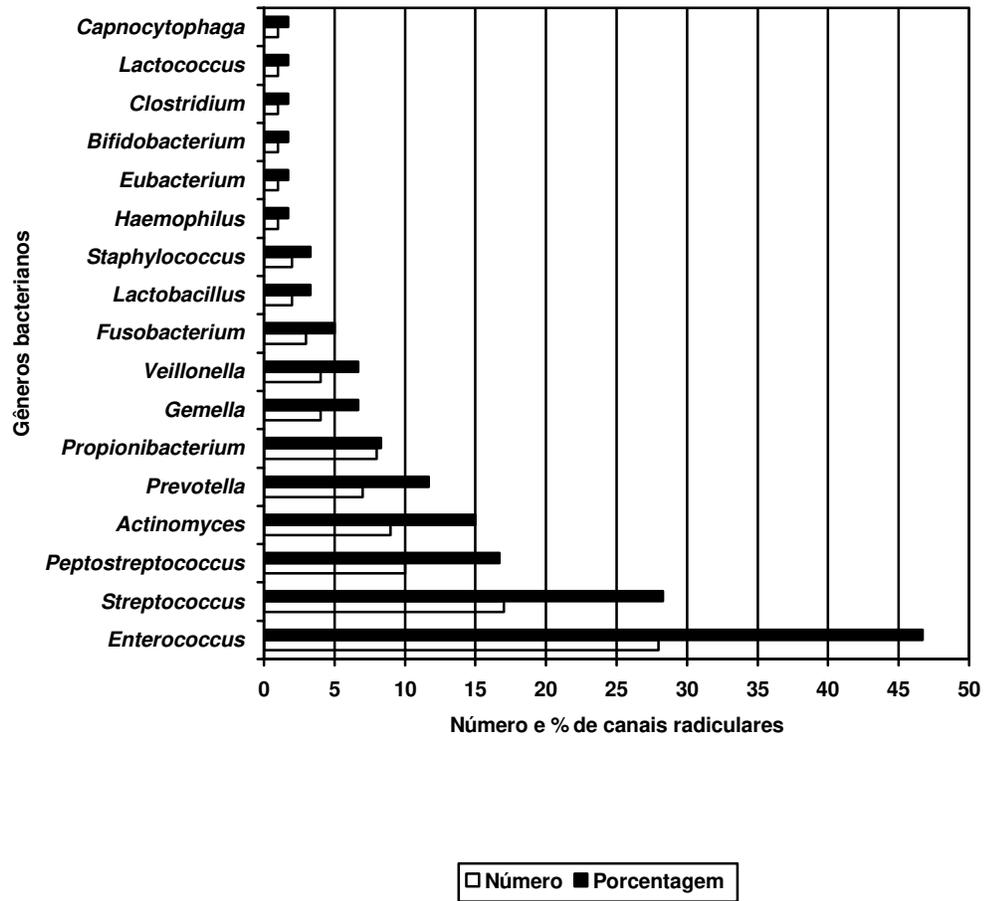


Figura 5.1. Prevalência dos gêneros bacterianos isolados em 60 canais de dentes com insucesso endodôntico

Tabela 5.3. Suscetibilidade *in vitro* de 21 cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de dentes com insucesso endodôntico

Antibióticos	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			% Suscetibilidade
	CIM ₅₀ *	CIM ₉₀ *	Varição	
Benzilpenicilina	2,0	3,0	1,0-4,0	100
Amoxicilina	0,5	0,75	0,25-0,75	100
Amoxicilina + ácido clavulânico	0,5	0,75	0,25-0,75	100
Eritromicina	1,0	2,0	0,38->256	28,5
Azitromicina	4,0	24,0	2,0->256	14,2
Vancomicina	3,0	3,0	1,0-4,0	100
Cloranfenicol	4,0	6,0	3,0->256	95,2
Tetraciclina	0,5	32	0,19->256	85,7
Doxiciclina	0,38	12	0,12->256	85,7
Ciprofloxacino	1,0	1,5	0,38-2,0	80,9
Moxifloxacino	0,38	0,5	0,19-0,5	100

* CIM₅₀= concentração inibitória mínima incluindo 50% das cepas,
CIM₉₀= concentração inibitória mínima incluindo 90% das cepas.

6. DISCUSSÃO

Microrganismos viáveis foram isolados de 51 dos 60 dentes estudados. No presente estudo, o método da cultura não identificou microrganismos em 15% dos casos após a remoção do material obturador dos canais radiculares. Esses resultados estão de acordo com os achados de PECIULIENE *et al.* (2000) e PECIULIENE *et al.* (2001) que detectaram ausência de crescimento bacteriano em 20% e 17,5% de casos de retratamento, respectivamente. Outros estudos, também utilizando o método da cultura, não observaram crescimento bacteriano em 26,6% (MOLANDER *et al.*, 1998), 37% (HANCOCK *et al.*, 2001) e 55,6% (SUNDQVIST *et al.*, 1998) dos casos com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais.

A presença de culturas negativas não significa a ausência total de microrganismos dos canais radiculares estudados. Embora as técnicas de coleta e cultura microbiológicas, utilizadas na presente pesquisa, sejam altamente efetivas para o isolamento de bactérias extremamente sensíveis ao oxigênio (GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1994, 1996a,b,c, 2004), é possível que alguns microrganismos tenham sido perdidos durante a coleta e processamento microbiológicos. SUNDQVIST *et al.* (1998) utilizaram técnicas de coleta e cultura semelhantes às utilizadas no presente estudo, e discutiram a dificuldade da coleta microbiológica em canais de dentes com tratamento endodôntico prévio. Microrganismos podem estar presentes em áreas inacessíveis à coleta, como as ramificações do sistema de canais radiculares ou em áreas apicais que podem ter sido obliteradas durante o tratamento endodôntico prévio; ou ainda, podem estar presentes em quantidade muito pequena no canal radicular, não sendo, desta forma, detectados pela técnica da cultura microbiológica. Além disso, microrganismos podem ser eliminados durante a remoção do material obturador prévio, mesmo utilizando apenas métodos mecânicos e sem solventes (SUNDQVIST *et al.*, 1998). Estudos recentes, utilizando métodos moleculares de identificação bacteriana, têm revelado a presença de microrganismos em todos os casos de insucesso endodôntico (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004; RÔÇAS *et al.*, 2004; GOMES *et al. in press*). Esses estudos comprovam que os

insucessos dos tratamentos endodônticos são, em sua maioria, de origem infecciosa, mesmo que o método da cultura seja incapaz de identificar bactérias.

Dos 51 canais que apresentaram crescimento bacteriano, 28 canais abrigavam apenas uma espécie bacteriana por canal radicular, 8 apresentavam duas, e 15 apresentavam três ou mais espécies. No estudo de SUNDQVIST *et al.* (1998), dos 24 dentes que apresentaram crescimento bacteriano, 19 casos eram caracterizados como monoinfecções, 4 apresentavam 2 microrganismos, e apenas 1 caso apresentava uma cultura polimicrobiana contendo 4 espécies bacterianas. Essa diferença entre os trabalhos quanto à frequência de monoinfecções e infecções polimicrobianas, provavelmente se deve à qualidade do tratamento endodôntico. SUNDQVIST *et al.* (1998) analisaram dentes com tratamentos endodônticos considerados de boa qualidade em quase totalidade dos casos, com exceção de 1 canal que apresentava uma obturação bastante deficiente em selamento, que foi o único canal que apresentou infecção polimicrobiana. Entretanto, os casos estudados, na presente pesquisa, apresentavam tratamentos endodônticos de boa (22 casos) e de má qualidade (38 casos); e dos 15 casos que continham três ou mais bactérias por canal radicular, 12 apresentavam uma obturação de má qualidade. Houve, portanto, uma correlação entre o número de espécies bacterianas presentes no canal radicular e a qualidade da obturação. Esses dados estão de acordo com os achados de SIQUEIRA & RÔÇAS (2004), que encontraram um maior número de espécies bacterianas em canais cuja distância entre o material obturador e o ápice era maior que 2 mm, quando comparado com canais obturados a 2 mm ou menos do ápice. Entretanto, em ambas situações, esses autores detectaram um maior número de espécies bacterianas por canal radicular, em casos de insucesso endodôntico, do que os relatados no presente estudo, sendo rara a presença de monoinfecções. Esse fato pode ser explicado pela diferença das técnicas utilizadas nos dois estudos, demonstrando a maior sensibilidade do método molecular utilizado por SIQUEIRA & RÔÇAS (2004) quando comparados com o método da cultura empregado no presente estudo.

Do total de cepas bacterianas isoladas, 57,4% eram bactérias anaeróbias facultativas e 83,3% bactérias Gram-positivas. Esses resultados estão de acordo com os

estudos realizados por SUNDQVIST *et al.* (1998) e HANCOCK *et al.* (2001), que encontraram, ambos, 58% de bactérias anaeróbias facultativas, e , respectivamente, 87% e 80% de microrganismos Gram-positivos em casos de insucesso do tratamento endodôntico. MOLANDER *et al.* (1998) verificaram uma freqüência de 69% de bactérias anaeróbias facultativas, e 74,3% de Gram-positivas. As bactérias anaeróbias facultativas mais freqüentemente isoladas, no presente estudo e nos estudos prévios, foram espécies do gênero *Enterococcus* e *Streptococcus*.

Aproximadamente 43% dos isolados eram bactérias anaeróbias estritas. *Peptostreptococcus* foi o gênero mais freqüentemente isolado, estando associado a sintomas clínicos. No presente estudo, *Prevotella* spp. (especialmente *P. intermedia/nigrescens*) e *Fusobacterium* spp. foram freqüentemente isolados de casos de retratamento com dor ou história de dor; enquanto *Prevotella intermedia/nigrescens* estava associada aos casos com dor à percussão. Esses achados estão de acordo com estudos prévios da microbiota de infecções endodônticas primárias (YOSHIDA *et al.*, 1987; BAUMGARTNER, 1991; GOMES *et al.*, 1994, 1996a, 2004), que relacionaram anaeróbios estritos com a presença de sintomatologia clínica, e *Streptococcus* e bactérias entéricas com casos assintomáticos.

Casos com fistula estavam associados à presença de *Streptococcus* spp. e *Actinomyces* spp. Em todos os casos, com exceção de um, os canais radiculares apresentavam uma microbiota polimicrobiana. Espécies anaeróbias estritas do gênero *Prevotella*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*, e outras espécies facultativas também foram isoladas no presente estudo. GOMES *et al.* (1994, 1996a) relataram em estudos prévios que a microbiota de canais radiculares de dentes com fistula era predominantemente mista.

Dos 60 casos de insucessos estudados, 45 apresentavam infiltrações coronárias através de restaurações defeituosas com material permanente ou provisório (22 e 10 casos, respectivamente), ou, ainda, ausência de restaurações (13 casos). No presente estudo, dentes com ausência de restaurações estavam associados à presença de

Streptococcus spp. e *Candida* spp. Esses resultados confirmam que fungos podem ser isolados de dentes com insucesso do tratamento endodôntico (NAIR *et al.*, 1990a; MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998), e que sua presença pode ser resultado de contaminação proveniente da cavidade oral (WALTIMO *et al.*, 1997). EGAN *et al.* (2002) relataram que a presença de fungos nos canais radiculares estava associada com a sua presença na saliva, e que houve alguma comunicação dos canais radiculares com o meio oral, através de infiltrações coronárias ou fístulas, nos casos onde fungos foram isolados.

No presente estudo, fungos foram isolados em 2/60 (3,3%) canais. Esse achado coincide com os achados de SUNDQVIST *et al.* (1998), MOLANDER *et al.* (1998) e HANCOCK *et al.* (2001) que isolaram *Candida albicans* em, respectivamente, 2/54 (3,7%), 3/100 (3%) e 1/54 (1,8%) canais de dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais. PECIULIENE *et al.* (2001) isolaram *Candida albicans* em 6/40 (15%) dentes estudados pelo método da cultura. Essa proporção é semelhante à encontrada por EGAN *et al.* (2002) em canais com tratamento endodôntico prévio, também pelo método da cultura (4/25 – 18%), e maior do que a encontrada por SIQUEIRA & RÔÇAS (2004) com o uso de métodos moleculares para identificação de *Candida albicans* em canais de dentes com insucesso do tratamento endodôntico (2/22 – 9%).

No presente estudo, *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüentemente isolada dos canais radiculares com fracasso do tratamento endodôntico, estando presente em 52,9% dos canais com culturas positivas. Esse resultado está de acordo com os estudos prévios realizados por MOLANDER *et al.* (1998), SUNDQVIST *et al.* (1998) e HANCOCK *et al.* (2001), que isolaram essa espécie bacteriana em, respectivamente, 47%, 38% e 32% dos canais radiculares infectados. PECIULIENE *et al.* (2000) e PECIULIENE *et al.* (2001), também utilizando o método da cultura, relataram maiores porcentagens desse microrganismo: 70% e 64%, respectivamente. GOMES *et al.* (*in press*) identificaram *Enterococcus faecalis* em 46,6% dos casos de insucesso pelo método da cultura, e em 76% através da análise do DNA das mesmas amostras; confirmando que *Enterococcus faecalis* é encontrado numa freqüência ainda maior em

casos de insucesso do tratamento endodôntico quando métodos moleculares de identificação são utilizados (RÔÇAS *et al.*, 2004; SIQUEIRA & RÔÇAS, 2004). Surpreendentemente, no estudo de GOMES *et al.* (*in press*), *Enterococcus faecalis* também foi encontrado na maioria (82%) dos casos de polpas necrosadas quando analisados pelo método molecular, enquanto pela cultura das mesmas amostras, esse microrganismo foi raramente isolado. Esses resultados sugerem que *Enterococcus faecalis* está freqüentemente presente na microbiota inicial de dentes com polpas necrosadas e lesões periapicais, porém em pequena quantidade, não detectável pelo método da cultura. 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 nesses casos.

Vários são os fatores que podem explicar a presença de *Enterococcus faecalis* em dentes com tratamento endodôntico prévio associados a lesões periapicais. Esse microrganismo têm demonstrado resistência aos procedimentos endodônticos de desinfecção durante o preparo químico-mecânico (HAAPASALO & ORSTAVIK, 1987; GOMES *et al.*, 1996b; SUNDQVIST *et al.*, 1998), e a capacidade de sobreviver em canais radiculares como microrganismos únicos sem a relação cooperativa de outras bactérias (FABRICIUS *et al.*, 1982). *Enterococcus faecalis* também têm demonstrado a capacidade de invadir túbulos dentinários (LOVE *et al.*, 2001) e de sobreviver em um ambiente onde os nutrientes são escassos, manter-se em fase latente e voltar a crescer quando os nutrientes se tornarem disponíveis (FIGDOR *et al.*, 2003). Esses nutrientes podem ser provenientes de fluidos teciduais da região periapical ou de infiltrações coronárias, e podem servir de substrato para cepas que sobreviveram após o preparo químico-mecânico, mantendo a infecção intra-radicular. Esses achados ressaltam que o sucesso do tratamento endodôntico depende, portanto, do controle da assepsia durante o tratamento, da máxima eliminação de microrganismos durante o preparo químico-mecânico, de uma obturação hermética e da prevenção da recontaminação do canal através de procedimentos restauradores adequados em um menor tempo possível após o tratamento endodôntico. Na presente pesquisa, 58/60 casos apresentavam selamento endodôntico e/ou coronário insatisfatórios, fatos que podem

ter contribuído para a alta prevalência de *Enterococcus faecalis* encontrada nos casos de insucesso estudados.

Os insucessos dos tratamentos endodônticos são, em sua maioria, resultados de infecções intra-radiculares e encontram-se geralmente associados a lesões periapicais crônicas. Portanto, o uso de antibióticos sistêmicos não estão indicados e nem são eficazes para o tratamento desses casos. Entretanto, a utilização dos mesmos pode ser indicada na profilaxia antibiótica em casos de risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana durante o retratamento endodôntico (ABBOTT *et al.*, 1990).

Segundo DEBELIAN *et al.* (1995), procedimentos durante o tratamento endodôntico podem lançar microrganismos do canal radicular para a corrente sanguínea, refletindo quantitativamente e qualitativamente a microbiota do local da infecção. Geralmente, após certas intervenções odontológicas em pacientes de risco, a endocardite seria causada pelos *Streptococcus* do grupo *viridans*; enquanto a endocardite provocada por *Enterococcus* spp. seria uma consequência mais comum após intervenções do trato gastrointestinal (DAJANI *et al.*, 1997). Entretanto, em casos de retratamento endodôntico, devido a alta prevalência de *Enterococcus faecalis* nos canais radiculares, esses microrganismos podem ser os agentes causadores da endocardite bacteriana.

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

Os resultados dos testes de suscetibilidade de 21 cepas de *Enterococcus faecalis*, isolados no presente trabalho, mostraram que essas cepas foram sensíveis, *in vitro*, ao grupo das penicilinas, porém, as concentrações inibitórias mínimas da amoxicilina foram inferiores às concentrações inibitórias mínimas da penicilina. Esses resultados estão de

acordo com os estudos de RAMS *et al.* (1992), que verificaram que enterococos são mais sensíveis à amoxicilina do que à benzilpenicilina.

No presente estudo, nenhuma cepa produziu beta-lactamase. Esse achado confirma achados prévios de que cepas de *Enterococcus faecalis* raramente produzem beta-lactamases (SHEPARD & GILMORE, 2002). Quando a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos ocorre, geralmente se deve a alterações nas enzimas às quais o antibiótico vai se ligar, diminuindo sua afinidade pelos mesmos (MORRISON *et al.*, 1997; FORBES *et al.*, 1998).

Os resultados do presente estudo mostraram que *Enterococcus faecalis* continuam suscetíveis, *in vitro*, à amoxicilina. Entretanto, a falta de resistência às penicilinas, nesse estudo, pode ser devido ao número reduzido de cepas investigadas e/ou a diferenças geográficas. Trabalhos têm relatado resistência às penicilinas entre cepas de enterococos isoladas de canais radiculares nos EUA (MATUSOW, 1981) e na Suécia (DAHLÉN *et al.*, 2000).

Além de diferenças geográficas, o padrão de resistência bacteriana pode variar com o decorrer do tempo. ZELDOW & INGLE (1962) e ENGSTRÖM (1964) reportaram que 100% dos enterococos isolados de canais radiculares eram sensíveis à eritromicina. HEINTZ *et al.* (1975) encontraram mais de 90% das cepas suscetíveis, enquanto STERN *et al.* (1990) encontraram 61,9% das cepas de enterococos sensíveis a essa droga. Os resultados do presente estudo confirmaram o achado de que a suscetibilidade de enterococos à eritromicina tem diminuído com o tempo. No presente estudo, observou-se uma grande variação das CIMs (0,5->256 µg/mL) da eritromicina capazes de inibir o crescimento de *Enterococcus faecalis*. Duas cepas foram classificadas como resistentes (CIM \geq 8 µg/mL) e 6 (28,5%) como sensíveis, enquanto a maioria dos isolados (65,4%) apresentaram um padrão de suscetibilidade intermediário. Resultados similares foram relatados por SEDGLEY *et al.* (2004), que encontraram, entre 12 enterococos isolados da cavidade oral, 2 cepas resistentes a eritromicina, 2 (16,6%) sensíveis, e 8 (66,6%) com um padrão intermediário. Esses estudos revelaram que a CIM

da eritromicina, quando testada contra enterococos, tem aumentado com o decorrer dos anos, sugerindo que enterococos orais têm se tornado menos suscetíveis a essa droga.

A azitromicina é capaz de atingir maiores concentrações sanguíneas do que a eritromicina, sem os efeitos gastro-intestinais adversos (GRAD, 1997; ANDRADE, 1999). A azitromicina, quando comparada com a eritromicina, apresentou ainda menor eficácia contra enterococos, com apenas 14,2% dos isolados suscetíveis *in vitro*. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os achados de FASS (1993). Esses autores também relataram que há resistência cruzada entre azitromicina e eritromicina, não sendo, portanto, a azitromicina uma droga substituta em casos de resistência à eritromicina.

No presente estudo, resistência à eritromicina e à azitromicina foi encontrada entre os isolados de *E. faecalis*. Esse microrganismo também apresenta resistência intrínseca à clindamicina (MURRAY, 1990; MORRISON *et al.*, 1997). Portanto, essa droga não é clinicamente efetiva contra *E. faecalis*. Logo, em casos de pacientes alérgicos a penicilinas, os regimes profiláticos alternativos recomendados para procedimentos odontológicos parecem ser de limitado valor contra enterococos. Devido a predominância de *E. faecalis* em dentes com insucesso do tratamento endodôntico, drogas alternativas devem ser consideradas para profilaxia, em casos de risco de endocardite, durante o retratamento endodôntico. Entre as drogas alternativas investigadas no presente estudo, algumas cepas de *E. faecalis* apresentaram resistência à tetraciclina, à doxiciclina, ao ciprofloxacino e ao cloranfenicol.

Resistência bacteriana a qualquer membro do grupo das tetraciclinas geralmente resulta em resistência cruzada a outras drogas do grupo (CHAMBERS, 2001). Este fato foi observado no presente estudo, onde as cepas resistentes ao cloridrato de tetraciclina também foram resistentes à doxiciclina, com esta mostrando menores CIMs contra *E. faecalis*. No presente estudo, resistência às tetraciclinas foi observada em 14,3% das cepas, o que está de acordo com os achados de DAHLÉN *et al.* (2000), que encontraram 13,8% dos enterococos isolados de canais radiculares resistentes à tetraciclina. Outros estudos têm relatado porcentagens ainda maiores de *E. faecalis* resistentes a essa

droga: 58% (RAMS *et al.*, 1992), 65.1% (UDO *et al.*, 2002) e 68.5% (COTTER & ADLEY, 2001). O aparecimento de cepas resistentes à tetraciclina tem diminuído a sua utilidade na clínica.

No presente estudo, cloranfenicol foi efetivo contra 95,23% das cepas. Esse achado está de acordo com os achados de SEDGLEY *et al.* (2004), que encontraram 91% dos enterococos orais sensíveis ao cloranfenicol. Entretanto, outros estudos têm relatado resistência a esse antibiótico em 20% a 42% (COTTER & ADLEY, 2001; UDO *et al.*, 2002) dos enterococos não-orais.

Entre as drogas testadas, vancomicina e moxifloxacino foram efetivas, *in vitro*, contra todas as cepas de *E. faecalis* estudadas. Vancomicina é uma droga altamente ativa contra bactérias Gram-positivas, entretanto, deve ser empregada somente no tratamento de infecções graves (ANDRADE, 1999; CHAMBERS, 2001). A administração de vancomicina é uma alternativa eficaz na profilaxia ou tratamento de endocardite bacteriana causada por estreptococos do grupo *viridans*, e também por enterococos, em pacientes de alto risco e alérgicos a penicilinas. Nesses casos, o tratamento da endocardite bacteriana causada por enterococos é realizado com o uso associado de vancomicina e gentamicina (MURRAY, 1990; GRAHAM & GOULD, 2002). Todas as cepas examinadas, no presente estudo, foram sensíveis à vancomicina. Estudos prévios da suscetibilidade de enterococos orais também têm demonstrado a alta suscetibilidade desses microrganismos à vancomicina (RAMS *et al.*, 1992; DAHLÉN *et al.*, 2000). Entretanto, estudos de enterococos não-orais têm ressaltado o aparecimento de cepas resistentes à vancomicina, especialmente cepas de *Enterococcus faecium* e, em menor frequência, cepas de *Enterococcus faecalis* (MURRAY, 2000; MALANI *et al.*, 2002). Essas cepas resistentes à vancomicina têm aparecido como os principais patógenos de infecções hospitalares, e freqüentemente possuem determinantes que conferem resistência a múltiplas drogas, de tal forma que poucas opções terapêuticas restam para tratar essas infecções (MORRISON *et al.*, 1997; RICE, 2001; SHEPARD & GILMORE, 2002).

Moxifloxacino foi um dos antibióticos mais eficazes contra *Enterococcus faecalis* estudados, com as menores CIM₅₀ e CIM₉₀, o que está de acordo com os dados relatados em estudos prévios (SPECIALE *et al.*, 2002; MATHER *et al.*, 2002). Estudos recentes têm revelado que moxifloxacino tem uma boa atividade antimicrobiana contra patógenos periodontais (MILAZZO *et al.*, 2002) e contra bactérias isoladas de abscessos dento-alveolares (SOBOTTKA *et al.*, 2002). Os últimos autores sugeriram o uso em potencial de moxifloxacino para o tratamento de infecções odontogênicas. O presente estudo revelou que moxifloxacino teve uma boa atividade *in vitro* contra as cepas de *Enterococcus faecalis* isoladas de canais radiculares, e parece ser uma alternativa razoável para pacientes alérgicos à penicilina ou com resistência a antibióticos prescritos comumente. Entretanto, por ser uma droga nova, não existe um número suficiente de trabalhos que permita avaliar a relação risco/benefício do moxifloxacino no tratamento ou profilaxia das infecções odontológicas. É importante ressaltar que o uso dessa droga é contra-indicado em crianças, jovens em fase de crescimento, grávidas e lactantes. Moxifloxacino também deve ser administrado com precaução em pacientes com história de desordem convulsiva e pacientes que fazem uso de certos antiarrítmicos. Futuras investigações envolvendo um número maior de bactérias isoladas dos canais radiculares, assim com a realização de estudos clínicos seriam necessários para testar o uso de moxifloxacino como uma droga alternativa quando a terapia antibiótica é indicada durante o tratamento ou retratamento endodôntico.

Nossos resultados mostraram que a microbiota do dente tratado endodonticamente associado à lesão periapical é composta em sua maioria por bactérias anaeróbias facultativas e predominantemente Gram-positivas, sendo *Enterococcus* o gênero bacteriano mais isolado. Entre as cepas de *Enterococcus faecalis*, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico apresentaram melhores resultados, ou seja, menores CIMs quando comparadas a penicilina. Amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico apresentaram atividade antibacteriana semelhante contra *Enterococcus faecalis*, com CIMs bem próximas, e os testes comprovaram que as cepas estudadas não produziam beta-lactamases. Desta forma, nesses casos, a associação de amoxicilina + ácido clavulânico não apresenta vantagem sobre o uso da amoxicilina de forma isolada. Logo, em pacientes de

risco ao desenvolvimento da endocardite bacteriana, ou quando indicada terapia antibiótica durante o retratamento endodôntico, os resultados do nosso trabalho suportam a escolha da amoxicilina como primeira opção de droga terapêutica, por apresentar uma boa atividade antibacteriana e ser de baixo custo. Para pacientes alérgicos a penicilina, moxifloxacino foi um dos antibióticos mais eficazes, *in vitro*, contra *Enterococcus faecalis*. Entretanto uma avaliação do risco/benefício da dose mínima dessa droga deve ser realizada antes da sua prescrição na clínica odontológica.

7. CONCLUSÕES

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

1. A microbiota dos canais de dentes tratados endodonticamente foi composta por um número limitado de espécies microbianas, predominantemente Gram-positivas. Anaeróbios facultativos, especialmente *Enterococcus faecalis*, são os microrganismos mais comumente isolados.

2. Infecções polimicrobianas e anaeróbios estritos são freqüentemente encontrados em canais de dentes tratados endodonticamente com sintomatologia clínica.

3. As cepas de *Enterococcus faecalis* foram sensíveis, *in vitro*, a amoxicilina e amoxicilina associada ao ácido clavulânico. Como a produção de beta-lactamases não foi detectada, em relação às cepas estudadas, a associação de amoxicilina + ácido clavulânico não apresenta vantagem sobre o uso da amoxicilina de forma isolada.

4. Todos os isolados foram sensíveis a vancomicina e moxifloxacino, enquanto a maioria foi sensível a cloranfenicol, ciprofloxacino, tetraciclina ou doxiciclina. Eritromicina e azitromicina foram menos eficazes contra as cepas estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBOTT PV, HUME WR, PEARMAN JW (1990) Antibiotics and endodontics. *Australian Dental Journal* **35**, 50-60.
- ADIB V, SPRATT D, NG Y-L, GULABIVALA K (2004) Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *International Endodontic Journal* **37**, 542-51.
- ALLEN RK, NEWTON CW, BROWN CE (1989) A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *Journal of Endodontics* **15**, 261-6.
- ALVES J, BARRIESH K, WALTON R, WILCOX L, WERTZ P, DRAKE D (1996) Endotoxin penetration from mixed culture through obturated, post-prepared canals. *Journal of Endodontics* **22**, 212.
- ANDERSSON MI, MACGOWAN AP (2003) Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51** (Suppl1), 1-11.
- ANDRADE ED (1999) *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 188 p.
- ANDRADE ED, PASSERI LA, MATTOS FILHO TR (1998) Prevenção da endocardite bacteriana – novas recomendações da American Heart Association. *Revista da Associação Paulista dos Cirurgiões-Dentistas* **52**, 353-7.
- BAUMGARTNER JC (1991) Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. *Current Opinion in Dentistry* **1**, 737-43.
- BAUMGARTNER JC, FALKER WA (1991) Bacteria in the apical 5mm of infected root canals. *Journal of Endodontics* **17**, 380-3.
- BENDER IB, SELTZER S (1952) Combination of antibiotics and fungicides used in treatments of the infected pulpless tooth. *Journal of the American Dental Association*, **29**, 235-41.
- BERG JO, NORD CE (1973) A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scandinavian Journal of Dental Research* **81**, 163-6.
- BOLMSTRÖM A (1993) Susceptibility testing of anaerobes with E-test. *Clinical Infectious Diseases* **16** (Supplement 4), S367-70.

- BRIGGS PFA, SCOTT BJJ (1997) Evidence-based dentistry: endodontic failure – how should it be managed? *British Dental Journal* **183**, 159-64.
- CAVALLERI G, CUZZOLIN L, URBANI G, BENONI G (1989) Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *Journal of Chemotherapy* **1**, 101-2.
- CHAMBERS HF (2001) Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edn, pp. 1239-72. New York, USA: McGraw-Hill.
- CHAMBERS HF, SANDE MA (1995) Antimicrobial agents. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE, eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9th edn. USA: Mc Grow-Hill Companies, pp 1032-41.
- CHÁVEZ DE PAZ LE, DAHLÉN G, MOLANDER A, MÖLLER A, BERGENHOLTZ G (2003) Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *International Endodontic Journal* **36**, 500-8.
- CHEUNG GS, HO MW (2001) Microbial flora of root canal treated teeth with associated asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiology and Immunology* **16**, 332-7.
- CHEUNG GS (1996) Endodontic failures – changing the approach. *International Dental Journal* **46**, 131-8.
- COTTER G, ADLEY CC (2001) Comparison and evaluation of antimicrobial susceptibility testing of enterococci performed in accordance with six national committee standardized disk diffusion procedures. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3753-6.
- DAHLÉN G, MÖLLER AJR (1992) Microbiology of endodontic infections. In: Slots J, Taubman MA, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 444-75.
- DAHLÉN G, PIPATTANAGOVIT P, ROSLING B, MÖLLER AJR (1993) A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 375-82.
- DAHLÉN G, SAMUELSSON W, MOLANDER A, REIT C (2000) Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiology and Immunology* **15**, 309-12.

- DAJANI AS, TAUBERT KA, WILSON W, BOLGER AF, BAYER A, FERRIERI P, GEWITZ MH, SHULMAN S, NOURI S, NEWBURGER JW, HUTTO C, PALLASCH TJ, GAGE TW, LEVISON ME, PETER G, ZUCCARO G (1997) Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *Journal of the American Medical Association* **277**, 1794-1801.
- DEBELIAN GJ, OLSEN I, TRONSTAD L (1995) Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endodontics and Dental Traumatology* **11**, 142-9.
- EGAN MW, SPRATT DA, NG Y-L, LAM JM, MOLES DR, GULABIVALA K (2002) Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **35**, 321-9.
- ENGSTRÖM B (1964) The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy* **15**, 87-106.
- ENGSTRÖM B, HARD AF, SEGERSTAD L, RAMSTRÖM G, FROSTELL G (1964) Correlation of positive cultures with prognosis for root canal treatment. *Odontologisk Revy* **15**, 275-80.
- FABRICIUS L, DAHLÉN G, HOLME SE, MÖLLER AJR (1982) Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* **90**, 200-6.
- FASS RJ (1993) Erythromycin, clarithromycin, and azitromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 2080-6.
- FIGDOR D, DAVIES JK, SUNDQVIST G (2003) Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiology and Immunology* **18**, 234-9.
- FORBES BA, SAHM DF, WEISSFELD AS (1998) *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10th edn. St Louis, MO, USA: Mosby, 1079 p.
- FRIEDMAN S, STABHOLTZ A (1986) Endodontic retreatment-case selection and technique. Part 1: criteria for case selection. *Journal of Endodontics* **12**, 28-33.
- FUKUSHIMA H, YAMAMOTO K, SAGAWA H, LEUNG KP, WALKER CB (1990) Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *Journal of Endodontics* **11**, 534-8.

- GOLDMAN M, PEARSON AH (1969) Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **28**, 897-905.
- GOMES BPFA (1995) *An investigation into the root canal microflora*. Manchester, UK: University of Manchester. PhD thesis.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD (1994) Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *International Endodontic Journal* **27**, 291-8.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD (1996a) Clinical significance of dental root canal microflora. *Journal of Dentistry* **24**, 47-55.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD (1996b) Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal* **29**, 235-41.
- GOMES BPFA, DRUCKER DB, LILLEY JD (1996c) Association of endodontic signs and symptoms with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal* **29**, 69-75.
- GOMES BPFA, PINHEIRO ET, GADÊ-NETO CR, SOUSA ELR, FERRAZ CCR, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 71-6.
- GOMES BPFA, PINHEIRO ET, SOUSA ELR, JACINTO RC, FERRAZ CCR, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ Culture and molecular examination for the presence of *Enterococcus faecalis* in dental root canals. *International Endodontic Journal* (in press)
- GRAD HA (1997) Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omega* **90**, 64-72.
- GRAHAM JC, GOULD FK (2002) Role of aminoglycosides in the treatment of bacterial endocarditis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 437-44.
- GUTIÉRREZ JH, BRIZUELA C, VILLOTA E (1999) Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation and overfilling of the root canals: a scanning electron microscopy study. *International Endodontic Journal* **32**, 40-8.
- HAAPASALO M, ORSTAVIK D (1987) *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of Dental Research* **66**, 1375-9.
- HAAPASALO M, RANTA H, RANTA K (1983) Facultative Gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontologica Scandinavica* **41**, 19-22.

- HANCOCK HH III, SIGURDSSON A, TROPE M, MOISEIWITSCH J (2001) Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **91**, 579-86.
- HEINTZ CE, DEBLINGER R, OLIET S (1975) Antibiotic sensitivities of enterococci isolated from treated root canals. *Journal of Endodontics* **1**, 373-6.
- HELING I, GORFIL C, SLUTZKY H, KOPOLOVIC K, ZALKIND M, SLUTZKY-GOLDBER I (2002) Endodontic failure caused by inadequate restorative procedures review and treatment recommendations. *Journal of Prosthetic Dentistry* **87**, 674-8.
- HEPWORTH MJ, FRIEDMAN S (1997) Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *Journal of Canadian Dental Association* **63**, 364-71.
- HOELLMAN DB, VISALLI MA, JACOBS MR, APPELBAUM PC (1998) Activities and time-kill studies of selected penicillins, β -lactamase inhibitor combinations, and glycopeptides against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 857-61.
- IDA RD, GUTMANN JL (1995) Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endodontics Dental Traumatology* **11**, 199-203.
- JACINTO RC, GOMES BPFA, FERRAZ CCR, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ (2003) Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* **18**, 285-92.
- KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **20**, 340-9.
- KRASEMANN C, MEYER J, TILLOSTON G (2001) Evaluation of the clinical microbiology profile of moxifloxacin. *Clinical Infectious Diseases* **32 (Suppl 1)**, S51-63.
- LIN ML, PASCON EA, SKRIBNER J, GÄNGLER P, LANGELAND K (1991) Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **11**, 603-11.

- LIN ML, PASCON EA, SKRIBNER J, GÄNGLER P, LANGELAND K (1992) Factors associated with endodontic treatment failures. *Journal of Endodontics* **18**, 625-7.
- LOPES HP, SIQUEIRA JR. JF, ELIAS CN (1999) Retratamento endodôntico. In: Lopes HP, Siqueira Jr. JF, eds. *Endodontia Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro, RJ, BR: Medsi, pp. 497-538.
- LOVE MR (2001) *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its rolr in endodontic failure. *International Endodontic Journal* **34**, 399-405.
- MAGURA ME, ABDEL HK, BROWN CE, NEWTON CW (1991) Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: an in vitro study. *Journal of Endodontics* **17**, 324-31.
- MALANI PN, THAL L, DONABEDIAN SM, ROBINSON-DUNN B, KAUFFMAN CA, CHOW JW, HERSHBERGER E, ZERVOS MJ (2002) Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* from Michigan hospitals during a 10 year period. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 841-3.
- MALOOLEY J, PATTERSON SS, KAFRAWY (1979) Response of periapical pathosis to endodontic treatment in monkeys. *Oral Surgery* **47**, 545-54.
- MATHER R, KARENCHAK L, ROMANOWSKI EG, KOWALSKI RP (2002) Fourth generation fluorquinolones: new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics. *American Journal of Ophthalmology* **133**,463-6.
- MATUSOW RJ (1981) Acute-alveolar cellulitis syndrome. Part II. Clinical assesment of antibiotic effectiveness against microbes isolated frm intact teeth. *Oral Surgery* **52**, 187-96.
- MILAZZO I, BLANDINO G, MUSUMECI R, NICOLETTI G, LO BUE AM, SPECIALE A (2002) Antibacterial activity of moxifloxacin against periodontal anaerobic pathogens involved in systemic infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **20**, 451-6.
- MIRANDA VC (1969) Identificação de microrganismos resistentes ao tratamento endodôntico, com especial referência aos estreptococos. *Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Araraquara* **3**, 73-95.
- MOENNING JE, NELSON CL, KOHLER RB (1989) The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **47**, 976-85.

- MOLANDER A, REIT C, DAHLEN G, KVIST T (1998). Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **31**, 1-7.
- MÖLLER AJR (1966) *Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies*. Göteborg, Sweden: Akademiförlaget.
- MÖLLER AJR, FABRICIUS L, DAHLÉN G, OHMAN A, HEYDEN G (1981) Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* **89**, 475-84.
- MONTGOMERY EH (2000) Antibióticos antibacterianos. In: YAGIELA JA, NEIDLE EA, DOWD FJ, eds. *Farmacologia e Terapêutica para Dentistas*. 4th ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., pp 468-502.
- MORRISON D, WOODFORD N, COOKSON B (1997) Enterococci as emerging pathogens of humans. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* **26**, 89S-99S.
- MUNDY LM, SAHAM DF, GILMORE M (2000) Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 513-22.
- MURDOCH DR, MIRRETT S, HARRELL LJ, MONAHAN JS, RELLER LB (2002) Sequential emergence of antibiotic resistance in enterococcal bloodstream isolates over 25 years. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3676-8.
- MURRAY BE (1990) The life and times of the enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews* **3**, 46-65.
- MURRAY BE (2000) Drug therapy: vancomycin-resistant enterococcal infections. *The New England Journal of Medicine* **342**, 710-21.
- NAIR PNR (1987) Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics* **13**, 29-39.
- NAIR PNR, SCHOEDER HE (1984). Periapical Actinomycosis. *Journal of Endodontics* **10**, 567-70.
- NAIR PNR, SJÖGREN U, FIGDOR D, SUNDQVIST G (1999) Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **87**, 617-27.
- NAIR PNR, SJÖGREN U, KREY G, KAHNBERG KE, SUNDQVIST G (1990a) Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-

- resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics* **16**, 580-8.
- NAIR PNR, SJÖGREN U, KREY G, SUNDQVIST G (1990b) Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *Journal of Endodontics* **16**, 589-95.
- NAIR PNR, SJÖGREN U, SCHIMACHER E, SUNDQVIST G (1993) Radicular cyst affecting a root-filled human tooth: a long-term post treatment follow-up. *International Endodontic Journal* **26**, 225-33.
- NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards (2002) Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Breakpoints for *Enterococcus* spp. M100-S12, **22**, 56-8.
- NODA M, KOMATSU H, INOUE S, SANO H (2000) Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exudate of persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics* **26**, 221-4.
- NORD CE, WORDSTRÖM T (1973) Susceptibility of haemolytic oral enterococci to eight antibiotics *in vitro*. *Acta Odontologica Scandinavica* **31**, 395-9.
- OLIPHANT CM, GREEN GM (2002) Quinolones: a comprehensive review. *American Family Physician* **65**, 455-64.
- PECIULIENE V, BALCIUNIENE I, ERIKSEN HM, HAAPASALO M (2000) Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *Journal of Endodontics* **26**, 593-5.
- PECIULIENE V, REYNAUD AH, BALCIUNIENE I, HAAPASALO M (2001) Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **34**, 429-34.
- PINHEIRO ET, GOMES BPFA, FERRAZ CCR, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ (2003) Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology* **18**, 100-3.
- PITT FORD TR (1982) The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal. *International Endodontic Journal* **15**, 16-22.

- RAMS TE, FEIK D, YOUNG V, HAMMOND BF, SLOTS J (1992) Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 249-52.
- RANTA K, HAAPASALO M, RANTA H (1988) Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aureginosa*. *Endodontics and Dental Traumatology* **4**, 269-72.
- RAY HA, TROPE M (1995) Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *International Endodontic Journal* **28**, 12-8.
- RICE LB (2001) Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 183-7.
- RÔÇAS IN, SIQUEIRA Jr JF, SANTOS KRN (2004) Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics* **30**, 315-20.
- ROLPH HJ, LENNON A, RIGGIO MP, SAUNDERS WP, MACKENZIE D, COLDERO L, BAGG J (2001) Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3282-9.
- ROSAN B (1997) Os estreptococos. In: Nisengarden RJ, Newman MG, eds. *Microbiologia Oral e Imunologia*. 2^a ed. Rio de Janeiro, RJ, BR: Guanabara Koogan, pp. 110-25.
- SATO T, HOSHINO E, UEMATSU H, NODA T (1993) Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microbiological Ecology in Health and Disease* **6**, 269-75.
- SEDGLEY CM, LENNAN SL, CLEWELL DB (2004) Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 95-101.
- SHEPARD BD, GILMORE MS (2002) Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection* **4**, 215-24.
- SIQUEIRA JF Jr (2001) Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International Endodontic Journal* **34**, 1-10.
- SIQUEIRA JF Jr, LOPES HP (1999) Microbiologia endodôntica. In: Lopes HP, Siqueira JF Jr., eds. *Endodontia Biologia e Técnica*. Rio de Janeiro, RJ, BR: Medsi, pp.185-216.
- SIQUEIRA Jr JF, RÔÇAS IN (2003) Polymerase chain reaction detection of *Propionibacterium propionicus* and *Actinomyces radicidentis* in primary and persistent endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **96**, 215-22.

- SIQUEIRA Jr JF, RÔÇAS IN (2004) Polymerase chain reaction- based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **97**, 85-94.
- SIREN EK, HAAPASALO PP, RANTA K, SALMI P, KEROSUO ENJ (1997) Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal* **30**, 91-5.
- SJÖGREN U, HÄGGLUND B, SUNDQVIST G, WING K (1990) Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *Journal of Endodontics* **16**, 498-504.
- SJÖGREN U, HAPPONEN RP, KAHNBERG KE, SUNDQVIST G (1988) Survival of *Arachnia propionica* in periapical tissue. *International Endodontic Journal* **21**, 277-82.
- SJÖGREN U., FIGDOR D, PERSSON S, SUNDQVIST G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **30**, 297-306.
- SMITH CS, SETCHELL DJ, HARTY FJ (1993) Factors influencing the success of conventional root canal therapy-a five-year retrospective study. *International Endodontic Journal* **26**, 321-33.
- SOBOTTKA I, CACHOVAN G, STURENBURG E, AHLERS MO, LAUFS R, PLATZER U, MACK D (2002) In vitro activity of moxifloxacin against bacteria isolated from odontogenic abscesses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 4019-21.
- SOUSA ELR, FERRAZ CCR, GOMES BPFA, PINHEIRO ET, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ (2003) Bacteriologic study of root canals with periapical abscesses. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **96**, 332-9.
- SPECIALE A, MUSUMECI R, BLANDINO G, MILAZZO I, CACCAMO F, NICOLETTI G (2002) Minimal inhibitory concentrations and time-kill determination of moxifloxacin against aerobic and anaerobic isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**, 111-8.
- STERN MH, DREIZEN S, OTT T, LEVY BM (1990) Analysis of positive cultures from endodontically treated teeth: a retrospective study. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **69**, 366-71.

- STRINDBERG LZ (1956) The dependence of the results of pulp therapy on certain factors: an analytical study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odontologica Scandinava* **14 (supplement 21)**, 1-175.
- SUNDQVIST G, FIGDOR D, SJOGREN U (1998). Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **85**, 86- 93.
- SUNDQVIST G & REUTERVING CO (1980) Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. *Journal of Endodontics* **6**, 602-6.
- SUNDQVIST G (1992a) Ecology of root canal flora. *Journal of Endodontics* **18**, 427-430.
- SUNDQVIST G (1992b) Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 257-62.
- SUNDQVIST G, JOHANSSON E, SJÖGREN U (1989) Prevalence of black-pigmented Bacteroides species in root canal infections. *Journal of Endodontics* **15**, 13-18.
- SWARTZ DB, SKIDMORE AE, GRIFFIN JA (1983) Twenty years of endodontic success and failure. *Journal of Endodontics* **9**, 198-202.
- TAKAHASHI K (1998) Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal* **31**, 311-25.
- TOMASZ A (1994) Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. *The New England Journal of Medicine* **28**, 1247-51.
- TORABNEJAD M, UNG B, KETTERING JD (1990) *In vitro* bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *Journal of Endodontics* **16**, 566-9.
- UDO EE, AL-SWEIH N, JOHN P, CHUG TD (2002) Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **43**, 233-8.
- WALKER (1992) Antimicrobial agents and chemotherapy. *In*: Slots J, Taubman MA, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, St Louis, MO, USA: Mosby Year Book, pp. 242-64.
- WALTIMO TMT, SIREN EK, TORKKO HLK, OLSEN I, HAAPASALO MPP (1997) Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **30**, 96-101.

- YOSHIDA M, FUKUSHIMA H, YAMAMOTO K, OGAWA K, TODA T, SAGAWA H
(1987) Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root
canals with periapical pathosis. *Journal of Endodontics* **13**, 24-8.
- ZELDOW BJ, INGLE JI (1962) Management of periapical infection: antibiotic sensitivity of
bacteria isolated from root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **15**,
721-6.



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



Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Investigação de microrganismos associados ao Insucesso do tratamento endodôntico e sua suscetibilidade a alguns antimicrobianos", sob o protocolo nº **054/2002**, da Pesquisadora **Erica Tavares Pinheiro**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Brenda P.F. A. Gomes**, está de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – FOP.

Piracicaba, 16 de agosto de 2002

We certify that the research project with title "Investigation of microorganisms associated with endodontic failure and their susceptibility to some antimicrobial agents", protocol nº **054/2002**, by Researcher **Erica Tavares Pinheiro** responsibility by Prof. Dr. **Brenda P.F. A. Gomes**, is in agreement with the Resolution 196/96 from National Committee of Health/Health Department (BR) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, August 16 2002

Fernanda Klein Marcondes

Profa. Dra. **Fernanda Klein Marcondes**

Secretária em Exercício
 CEP/FOP/UNICAMP

Pedro Luiz Rosalen

Prof. Dr. **Pedro Luiz Rosalen**

Coordenador em Exercício
 CEP/FOP/UNICAMP

ANEXO II. PUBLICAÇÕES DA AUTORA

PINHEIRO ET, GOMES BPFA, FERRAZ CCR, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, SOUZA-FILHO FJ (2003) Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology* **18**, 100-3.

PINHEIRO ET, GOMES BPFA, FERRAZ CCR, SOUSA ELR, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ (2003) Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal* **36**, 1-11.

PINHEIRO ET, GOMES BPFA, DRUCKER DB, ZAIA AA, FERRAZ CCR, SOUZA-FILHO FJ (2004) Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal* **37**, 756-763.

GOMES BPFA, **PINHEIRO ET**, GADÊ-NETO CR, SOUSA ELR, FERRAZ CCR, ZAIA AA, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 71-6.

Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ.
Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility.

Oral Microbiol Immunol 2003; 18: 100–103. © Blackwell Munksgaard, 2003.

Studies of the microbiota from the canals of teeth with failure of endodontic therapy have revealed that it differs markedly from that of untreated necrotic dental pulps. This study aimed to evaluate the microbiota of 30 root-filled teeth with persisting periapical lesions and to test the antibiotic susceptibility of the most prevalent species. Microbial samples, isolation and speciation were done using advanced microbiologic techniques for anaerobic species. A total of 55 bacterial species were isolated, 80% were gram-positives and 58% facultative anaerobic microorganisms. The bacterial genera most frequently recovered were *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* and *Actinomyces*. Antibiotic sensitivity of *Enterococcus faecalis* and *Peptostreptococcus* spp. was accomplished with the E-test system. All species studied were susceptible to benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin combined with clavulanate. However, 20% of the *E. faecalis* strains were resistant to erythromycin and 60% to azithromycin. It was concluded that microbial flora in canals after endodontic failure comprised predominantly facultative anaerobes and gram-positive species. *E. faecalis* was the species most frequently isolated and showed erythromycin and azithromycin resistance among the isolates.

E. T. Pinheiro, B. P. F. A. Gomes,
C. C. R. Ferraz, F. B. Teixeira,
A. A. Zaia, F. J. Souza Filho
Endodontic Area, Dental School of
Piracicaba, University of Campinas,
Piracicaba, SP, Brazil

Key words: endodontic failure;
microbiology; root canal therapy; antibiotic
susceptibility

Brenda P. F. A. Gomes, Endodontia,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba,
FOP-UNICAMP, Avenida Limeira, 901
Piracicaba, SP 13414-018, Brazil
Tel: +55 19 3412 5215; fax: +55 19 3412
5218; e-mail: bpgomes@fop.unicamp.br
Accepted for publication September 18, 2002

The major factor associated with endodontic failure is the persistence of microbial infection in the root canal system (26). These microorganisms may have survived the biomechanical procedures (27) or invaded the canal via coronal leakage of the root filling (3, 25).

Studies have revealed that the root canal microbiota of teeth with failed endodontic treatment differs from that normally found in untreated teeth (14, 21, 22, 30). It appears to be a very limited assortment of microorganisms, with predominantly facultative anaerobic gram-positive species, especially *Enterococcus faecalis*.

The genus *Enterococcus*, which is part of the normal flora of the human gastrointestinal tract and female genital tract, is a well-recognized cause of endocarditis, and has developed high level resistance to antimicrobial agents (11, 24).

Although chronic infections, such as apical periodontitis in root-filled teeth, generally do not require antibiotic therapy, its prophylactic use has been recommended for patients at risk of infective endocarditis during endodontic re-treatment (1). Thus, the aim of this study was to investigate the microorganisms most commonly isolated from canals after the removal of root-filling material during

endodontic re-treatment, and to test their antimicrobial susceptibility.

Material and methods

Clinical material

Patients were selected from those attending the Piracicaba Dental School, State University of Campinas, UNICAMP, SP, Brazil, for nonsurgical endodontic re-treatment. Thirty teeth that had previously been root-filled for more than 4 years and which showed radiographic evidence of apical periodontitis were included in the study. A detailed medical and dental history was obtained from each patient. Patients

medically compromised or having received antibiotic treatment in the last 3 months were excluded from the study. The Ethical Committee in Research of the Dental School of Piracicaba approved a protocol describing the specimen collection for this investigation, and all patients signed an informed consent to participate in the study.

Sampling procedure

All coronal restorations, posts and carious defects were removed. After access cavity preparation, the teeth involved were individually isolated from the oral cavity with a rubber dam, and disinfection was carried out using 30% hydrogen peroxide and then 2.5% sodium hypochlorite. The solution was inactivated with 5% sodium thiosulfate in order to avoid interference with bacteriological sampling. Aseptic techniques were used throughout root canal therapy and sample acquisition. In each case a single root canal was sampled in order to confine the microbial evaluation to a single ecological environment. In multi-rooted teeth, the root with periapical lesion was selected. If there were periapical lesions in all roots, the wider canal would be chosen. The root-filling was removed using Gates Glidden drills (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and endodontic files without the use of chemical solvents. Irrigation with sterile saline solution was performed in order to remove any remaining treatment materials and to moisten the canal prior to sample collection.

For microbial sampling, a sterile paper point was introduced into the full length of the canal (as determined with a pre-operative radiograph), and kept in place for 60 s. In the cases that had previously been irrigated with saline, as many paper points as possible were used to absorb all liquid or fluid inside the canal. The operation field was flushed with nitrogen gas during sampling by means of a sterile cannula connected to the gas cylinder. The paper point sample from the root canal was immediately transferred to a transport medium-VMGA III (4, 15) and transported within 15 min to the anaerobic workstation (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) in the microbiology laboratory. The maximum time between sample collection and laboratory processing was 4 h.

Microbial isolation and species determination

Inside the anaerobic workstation, the tubes containing the transport medium were

shaken in a mixer for 60 s (Agitador MA 162-MARCONI, São Paulo, SP, Brazil). Serial 10-fold dilutions were made up to 1/10⁸ in pre-reduced Fastidious Anaerobe Broth (FAB, Lab M, Bury, UK) and 50 µl of each serial dilution were plated onto several media, as follows: 5% defibrinated sheep blood FAA alone, and supplemented with nalidixic acid (0.001%, w/v), with nalidixic acid and vancomycin (0.00025%, w/v), and with neomycin (0.0075%, w/v) for anaerobes (all of these isolation media were purchased from Lab M, Bury, UK); 5% defibrinated sheep blood Columbia agar (OXOID, Hampshire, UK) plates for aerobes; and Sabouraud agar (OXOID) supplemented with 100 µg/ml of chloramphenicol for yeasts.

For anaerobic culture, the plates were incubated at 37°C in an atmosphere of 10% H₂, 10% CO₂ and 80% N₂ for 2, 5 and 14 days. Columbia agar plates were incubated aerobically at 37°C for 2 days, and Sabouraud agar plates were kept at room temperature for up to 5 days.

After incubation, each plate was examined and the different colony types subcultured non-selectively onto blood FAA plates to obtain pure culture. The colonies were selected for further study based on appearance. The pure cultures were then Gram-stained, tested for catalase production and their gaseous requirements established by incubation for 2 days aerobically and anaerobically. These procedures permitted selection of the appropriate kit for identification as follows: Rapid ID 32 A (Bio Merieux, Marcy-l'Étoile, France) for obligately anaerobic gram-negative and -positive rods; Rapid ANA II System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA) for obligately anaerobic gram-positive cocci; API Staph (Bio Merieux) for staphylococci and micrococci; Rapid ID 32 Strep (Bio Merieux) for streptococci; Rapid NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc.) for *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* and *Actinobacillus*; ID 32C Kit (Bio Merieux) for yeast identification.

For the black-pigmenting gram-negative anaerobes, the following additional tests were also performed:

- fluorescence under long-wave (366 nm) UV light;
- haemagglutination of 3% sheep erythrocytes;
- lactose fermentation by application of the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl-β-galactoside (Sigma Chemical Co., St Louis, MO-M-1633), according to Alcoforado et al. (2);
- trypsin-like activity by application of the synthetic fluorogenic peptide 7-(N-

carbobenzoxy-glycylglycylarginin-7-amido)-4-methyl coumarin-HCl (C-9396) (7, 28).

Antimicrobial susceptibility tests

The antimicrobial susceptibility of isolates was investigated by means of the E-test System (AB BIODISK, Solna, Sweden).

The strains isolated of *E. faecalis* (*n* = 10), facultative anaerobic gram-positive cocci, were tested for their susceptibility/resistance to benzylpenicillin (PG), amoxicillin (AC), amoxicillin combined with clavulanate (XL), erythromycin (EM), and azithromycin (AZ). Clindamycin was not tested because it is not clinically effective for *Enterococcus* spp. (19). Mueller Hinton agar plates (OXOID) 4 mm thick were inoculated using a swab that had been submerged in a bacterial suspension standardized to match the turbidity of the 0.5 McFarland standard. The surface of the plate was swabbed in three directions to ensure a complete distribution of the inoculum over the entire plate. Within 20 min of inoculation, the antimicrobial agents' strips were applied and the plates were inverted for incubation at 35°C in air for 16–18 h. After incubation, the plate was examined and an elliptical zone of growth inhibition was seen around the strip. The minimum inhibitory concentration (MIC) was read from the scale on the strip at the intersection of the growth with the E-strip. Once the MICs for the antimicrobial agents had been recorded, they were translated into interpretative categories of susceptible, intermediate, or resistant according to the guidelines of NCCLS (M100 S10) (19).

Peptostreptococcus spp. (*n* = 6), obligate anaerobic gram-positive cocci, were also tested for their susceptibility/resistance to benzylpenicillin (PG), amoxicillin (AC), amoxicillin combined with clavulanate (XL) and clindamycin (CM). Obligate anaerobe resistance to erythromycin (EM) and azithromycin (AZ) could not be confidently determined with the E-test system because MIC break-points for resistance have not been determined to date (18, 32). Brucella agar (OXOID) supplemented with 5% defibrinated sheep, 1% vitamin K and 0.5% hemin were inoculated with a bacterial suspension standardized to match the turbidity of the 1 McFarland standard, the strips were applied, and the plates were incubated at 37°C in an atmosphere of 10% H₂, 10% CO₂ and 80% N₂ for 24–48 h. The MICs values were interpreted according to the guidelines of NCCLS (M100 S8/M11 A4) (18). All the tests were done in duplicate.

Results

A total of 56 cultivable isolates belonging to 29 different species (Table 1) were recovered from the 30 root canals examined after root filling removal. Six root canals had no cultivable bacteria; 13 cases presented a single microorganism, in six of them *E. faecalis* was the only microorganism isolated in the canal; two cases presented two species (*E. faecalis* and *Propionibacterium acnes*, *Peptostreptococcus micros* and *P. prevotii*); and nine were polymicrobial infections consisting of three or more species per canal.

Facultative anaerobes accounted for 58% of all species isolated, and obligate anaerobes accounted for 42%. There was a predominance of gram-positive species (80%).

The bacterial genera most frequently recovered from the root canals were *Enterococcus* (36.7%), *Streptococcus* (30%), *Peptostreptococcus* (23.3%), *Actinomyces* (13.3%), *Prevotella* (10%), *Staphylococcus* (10%), *Gemella* (10%), *Fusobacterium* (6.7%), *Veillonella* (6.7%), *Lactobacillus* (6.7%), *Propionibacterium* (3.3%) and *Haemophilus* (3.3%).

• *Enterococcus faecalis* was the bacterial species most frequently recovered, being found in 11 (45.8%) of the 24 canals with bacteria. These microorganisms were tested for their antimicrobial susceptibility. All *E. faecalis* strains studied were susceptible to benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin combined with clavulanate. However, MIC of amoxicillin and amoxicillin combined with clavulanate (0.38 0.75 µg/ml) was lower than for benzylpenicillin (1.5 3.0 µg/ml). The MIC of erythromycin varied between 0.5 and >256 µg/ml and resistance was verified

with two isolates. Six strains were found to be resistant to azithromycin (8 to >256 µg/ml).

• *Peptostreptococcus prevotii* was the second bacterial species most commonly isolated (five strains). Some species of *Peptostreptococcus*, as the most prevalent anaerobes, were also tested with the E-test System. *Peptostreptococcus* spp. were susceptible to all antibiotics studied presenting low MIC values: benzylpenicillin (0.094 0.38 µg/ml); amoxicillin (0.25 0.5 µg/ml); amoxicillin combined with clavulanate (0.19 0.75 µg/ml) and clindamycin (0.19 0.38 µg/ml).

Discussion

Microorganisms were recovered from 24 (80%) teeth. In 13 cases, one strain per canal was found. Of the total microbial species isolated, 80% were gram-positives and 58% facultative anaerobic microorganisms. These findings agree with those reported by Sundqvist et al. (30) who found mono-infections in 19 of 24 root-filled teeth with microbial growth, 58% of facultative anaerobes and 87% gram-positive microorganisms.

The microflora of root canals with failed treatment differs from that encountered in necrotic dental pulp, which is mixed, comprising gram-negative and -positive and mostly anaerobic microorganisms (9, 10, 31).

In the present study, the most frequently isolated bacterial genera from root-filled teeth with periapical lesions were *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* and *Actinomyces*, in agreement with previous findings (14, 30). *Candida albicans* was recovered in one case, confirming

the fact that fungi can be found in cases of endodontic failure (14, 16, 22, 30).

E. faecalis, which makes up a small percentage of the flora in the original root canal infection, is the bacterial species most frequently recovered in root-filled teeth. In this study, they were isolated from 45.8% of the canals with bacterial growth. This finding agrees with those reported by Molander et al. (14) and Sundqvist et al. (30), who respectively found *E. faecalis* in 47 and 38% of previously root-treated canals with positive culture. Peciulienė et al. (21, 22) reported (in two studies) a higher isolation frequency of this microorganism: 70 and 64%.

E. faecalis is a well-recognised cause of endocarditis. In compromised patients, antibiotic prophylaxis to prevent endocarditis that occurs following endodontic re-treatment of root-filled teeth should be directed primarily against these microorganisms. Emerging antibiotic resistance in *Enterococcus* spp. has been shown in recent studies (11), especially against penicillin, the drug of choice.

Our results showed that all *E. faecalis* strains studied were susceptible to benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin combined with clavulanate. However, the MIC of amoxicillin and amoxicillin combined with clavulanate was lower than for benzylpenicillin. These findings are in agreement with Nord & Wadström (20) and Rams et al. (24) who found that oral enterococci were more sensitive to ampicillin than to benzylpenicillin. Nevertheless, the lack of enterococcal resistance to penicillins in this study may be due to the limited number of strains investigated. The presence of enterococcal strains resistant to penicillin and ampicillin has been reported in endodontic infections (5, 13), which underlines the need to perform susceptibility tests of these isolates.

In this study, erythromycin resistance was detected among the isolates. Previous studies have also found *Enterococcus* strains resistant to erythromycin (20, 24, 29). Fass (8) reported in his study that there was cross-resistance between azithromycin and erythromycin, and that azithromycin was less effective against *Enterococcus* spp. than erythromycin. This was also observed in our study.

The *Enterococcus* strains studied showed low susceptibility for azithromycin and erythromycin. Furthermore, clindamycin and cephalosporins are not clinically effective for *Enterococcus* spp. (19). So, when patients are allergic to penicillins, the alternative prophylactic regimens recommended for dental

Table 1. Prevalence of microbial species found in two or more of 30 root-filled canals

Microbial species	No. of root canals	Percentage of root canals
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	36.7
<i>Streptococcus sanguis</i>	3	10
<i>Streptococcus mitis</i>	2	6.7
<i>Streptococcus constellatus</i>	2	6.7
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	5	16.7
<i>Peptostreptococcus micros</i>	2	6.7
<i>Prevotella buccae</i>	2	6.7
<i>Actinomyces naeshundii</i>	2	6.7
<i>Gemella morbillorum</i>	3	10
<i>Staphylococcus lentus</i>	2	6.7
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	2	6.7
<i>Veillonella</i> spp.	2	6.7
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	6.7

The following species were isolated from single root canal: *Streptococcus anginosus*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. salivarius*, *Peptostreptococcus magnus*, *P. saccharolyticus*, *Prevotella intermedia*, *P. melanogenica*, *P. corporis*, *P. loeschii*, *Actinomyces odontolyticus*, *A. viscosus*, *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Haemophilus aphrophilus*, *Candida albicans*.

procedures (6) are of limited value against enterococci. Our data suggest that, due to the predominance of *E. faecalis* in root-filled teeth with periapical lesions, alternative drugs should be considered for prophylaxis in individuals at risk for endocarditis during endodontic re-treatment. Further investigation involving a larger number of enterococcal strains isolated from endodontic infections and testing different antibiotics, such as vancomycin and aminoglycosides, would improve knowledge about the patterns of susceptibility of oral enterococci.

Peptostreptococcus spp. were highly susceptible to benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin combined with clavulanate. These results are in agreement with Yamamoto et al. (1989). However, Hunt & Meyer (12) detected emerging resistance to penicillin in *Peptostreptococcus* spp. isolated from root canals with acute symptoms. Clindamycin was also effective against all *Peptostreptococcus* spp. studied, confirming previous findings of the high effectiveness of this drug in anaerobic infections (7, 13, 23).

In conclusion, our results have shown that the flora of canals with failure of root canal treatment comprised a limited number of microbial species, predominantly gram-positive ones. Facultative anaerobes, especially *E. faecalis*, were the microorganisms most commonly isolated from teeth with failed endodontic treatment. The strains studied were susceptible to benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin combined with clavulanate. However, *E. faecalis* showed erythromycin and azithromycin resistance among the isolates.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP and CNPq.

References

- Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. *Aust Dent J* 1990; **35**: 50–60.
- Alcoforado GAP, McKay TL, Slots J. Rapid method for detection of lactose fermentation oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 1987; **2**: 35–38.
- Cheung GSP. Endodontic failures – changing the approach. *Int Dent J* 1996; **46**: 131–138.
- Dahlén G, Pipattanasavit P, Rosling B, Möller AJR. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiol Immunol* 1993; **8**: 375–382.
- Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000; **15**: 309–312.
- Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, et al. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *JAMA* 1997; **277**: 1794–1801.
- Ernest MA, Conte MV, Keudell KC. Antibiotic sensitivity patterns of facultative and obligate anaerobic bacteria from pulp canals. *J Endod* 1977; **3**: 106–109.
- Fass RJ. Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare *in vitro* activities and describe cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; **37**: 2080–2086.
- Gomes BPFA. An investigation into the root canal microflora. PhD Thesis. Manchester, UK: University of Manchester, 1995.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996; **24**: 47–55.
- Heath CH, Blackmore TK, Gordon DL. Emerging resistance in *Enterococcus* spp. *Med J Aust* 1996; **164**: 116–120.
- Hunt DE, Meyer RA. Continued evolution of the microbiology of oral infections. *J Am Dent Assoc* 1983; **107**: 52–54.
- Matusow RJ. Acute-alveolar cellulitis syndrome. Part II. Clinical assessment of antibiotic effectiveness against microbes isolated from intact teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; **52**: 187–196.
- 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. *Odontol Tidskr* 1966; **74** (Spec Iss): 1–380.
- 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* 1990; **16**: 580–588.
- Nakamura M, Mashimo PA, Slots J. Dipeptidyl arylamidase activity of *Bacteroides gingivalis*. *Microbiol Lett* 1984; **24**: 157–160.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). MIC Interpretative Standards ($\mu\text{g/mL}$) for anaerobes. M100-S8 M11-A4, 1997: 17: 22.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). MIC Interpretative Standards ($\mu\text{g/mL}$) for *Enterococcus* spp. M100-S10, 2000: 26–28.
- Nord CE, Wordström T. Susceptibility of haemolytic oral enterococci to eight antibiotics *in vitro*. *Acta Odontol Scand* 1973; **31**: 395–399.
- Peculiene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *J Endod* 2000; **26**: 593–595.
- Peculiene 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, Metavish D. Azithromycin – a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs* 1992; **44**: 750–799.
- Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 1992; **7**: 249–252.
- 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**: 12–18.
- Siqueira JF, Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; **34**: 1–10.
- Sjögren U, Fidor 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.
- Slots J. Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescent assay for trypsin-like activity. *Oral Microbiol Immunol* 1987; **2**: 139–141.
- 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**: 366–371.
- Sundqvist G, Fidor D, Sjögren 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. Ecology of root canal flora. *J Endod* 1992; **18**: 427–430.
- Vigil GV, Wayman BE, Dazey SE, Fowler CB, Bradley DV. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *J Endod* 1997; **23**: 110–114.
- Yamamoto K, Fukushima H, Tsuchia H, Sagawa H. Antimicrobial susceptibilities of *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, and *Bacteroides* isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 1989; **15**: 112–116.

Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions

E. T. Pinheiro, B. P. F. A. Gomes, C. C. R. Ferraz, E. L. R. Sousa, F. B. Teixeira & F. J. Souza-Filho

Endodontic Department, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, UNICAMP, Piracicaba, SP Brazil

Abstract

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal* 36, 1–11, 2003.

Aim The objective of the present study was to identify the microbial flora within root canals of teeth with failed root-canal treatment and to determine the association of the various species with clinical features.

Methodology Sixty root-filled teeth with persisting periapical lesions were selected for this study. During nonsurgical endodontic re-treatment, the root-filling material was removed and the canals were sampled. Microbial sampling, isolation and species determination were performed using advanced microbiological techniques for anaerobic species. The association of microbiological findings with clinical features was investigated.

Results Microorganisms were recovered from 51 teeth. In most cases, one or two strains per canal were found. Of the microbial species isolated, 57.4% were facultative anaerobic species and 83.3% Gram-positive microorganisms. *Enterococcus faecalis* was the most

frequently recovered bacterial species. Obligate anaerobes accounted for 42.6% of the species and the most frequently isolated genera was *Peptostreptococcus*, which was associated with clinical symptoms ($P < 0.01$). Significant associations were also observed between: (a) pain or history of pain and polymicrobial infections or anaerobes ($P < 0.05$); (b) tenderness to percussion and *Prevotella intermedia/P. nigrescens* ($P < 0.05$); (c) sinus and *Streptococcus* spp. ($P < 0.001$) or *Actinomyces* spp. ($P < 0.01$); (d) coronally unsealed teeth and *Streptococcus* spp. or *Candida* spp. (both with $P < 0.01$).

Conclusion The microbial flora in canals after failure of root-canal treatment were limited to a small number of predominantly Gram-positive microbial species. Facultative anaerobes, especially *E. faecalis*, were the most commonly isolated microorganisms, however, polymicrobial infections and obligate anaerobes were frequently found in canals of symptomatic root-filled teeth.

Keywords: endodontic failure, microbiology, root-canal therapy.

Received 4 June 2001; accepted 16 August 2002

Introduction

Bacteria or their products are considered to be the primary aetiological agents of pulpal necrosis and periapical lesions (Kakehashi *et al.* 1965, Möller *et al.* 1981, Takahashi 1998). Therefore, their elimination is one of the most important steps in root-canal treatment. In most cases failure of root-canal treatment occurs when treatment

procedures have not met a satisfactory standard for control and elimination of infection (Nair *et al.* 1990, 1999, Lin *et al.* 1991). Persisting bacteria in root canals may be those originally present in the necrotic pulps that survive the biomechanical procedures, which may be located in missed canals or uninstrumented areas of the canals (Fukushima *et al.* 1990, Ida & Gutmann 1995, Sjögren *et al.* 1997). Conversely, bacteria may originate from the oral cavity, contaminate the root canal during treatment owing to inadequate aseptic control (Siren *et al.* 1997), or invade the root-filling via coronal leakage after root-canal treatment (Ibrabinejad *et al.* 1990, Magura *et al.* 1991, Ray & Trope 1995, Cheung 1996).

Correspondence: Dr Brenda P. F. A. Gomes, PhD, MSc, BDS, Endodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-UNICAMP, Avenida Limeira 901, Piracicaba 13414-018, SP, Brazil (Tel.: +55 19 3412 5215, fax: +55 19 3412 5218; e-mail: bpgomes@fop.unicamp.br).

Although it has been reported that nonmicrobial factors may be implicated in root-canal treatment failure, the literature suggests that persistent intraradicular or secondary infections are the major causes of the failure of root-canal treatment (Siqueira 2001). Recent studies using advanced microbiological techniques for anaerobic species (Molander *et al.* 1998, Sundqvist *et al.* 1998, Peciulienė *et al.* 2000, 2001) have revealed the composition of root-canal microbiota after failed treatment differs from that normally found in untreated teeth. The necrotic pulp presents a polymicrobial flora characterized by a wide variety of combinations of bacteria, averaging 4–7 species per canal, predominantly anaerobic, with approximately equal proportions of Gram-negative and -positive bacteria (Sundqvist *et al.* 1989, Baumgartner & Falke 1991, Sundqvist 1992a,b, Sato *et al.* 1993, Gomes *et al.* 1994, 1996a,b; Gomes 1995, Baumgartner *et al.* 1999). In contrast, the microbial flora detected in previously root-filled teeth with apical periodontitis can be characterized as monoinfection with predominantly Gram-positive microorganisms, with approximately equal proportions of facultative and obligate anaerobes (Sundqvist *et al.* 1998). Molander *et al.* (1998) found that facultative anaerobic species predominated amongst the isolates (69% of identified strains). *Enterococcus faecalis* were the most commonly isolated species from root canals of teeth with failed endodontic treatment (Molander *et al.* 1998, Sundqvist *et al.* 1998, Peciulienė *et al.* 2000, 2001).

Whereas follow-up studies on the root-canal treatment report success rates of 85–96% (Swartz *et al.* 1983, Sjögren *et al.* 1990, Smith *et al.* 1993), the literature has indicated that the success of re-treatment of teeth with apical periodontitis is lower, with an overall success rate of 66% (Allen *et al.* 1989, Hepworth & Friedman 1997). Molander *et al.* (1998) suggested that this poorer prognosis in root-canal re-treatments may be associated with difficulties in the elimination of the particular microflora in cases of root-canal treatment failure. A thorough knowledge of this microflora could guide new strategies to combat infection, leading to a better prognosis for root-canal re-treatments. The aim of the present study was to investigate the microbial flora of teeth with failed root-canal treatment and the association of constituent species with clinical features.

Materials and methods

Clinical material

Patients were selected from those who attended the Piracicaba Dental School, SP, Brazil, with a need for

nonsurgical endodontic re-treatment. A detailed medical and dental history was obtained from each patient. Patients who had received antibiotic treatment during the last 3 months or had a general disease were excluded from the study. The Ethical Committee in Research of the Dental School of Piracicaba approved a protocol describing the specimen collection for this investigation, and all patients signed informed consent to participate in the study.

Sixty teeth were included; all had been previously root filled and showed radiographic evidence of apical periodontitis. Failure of root-canal treatment was determined on the basis of clinical and radiographical examinations. Most of the teeth (90%) had been root-canal-treated more than 4 years ago; in six cases teeth had been root filled more than 2 years ago and the patients presented with persistent symptoms and/or discomfort to percussion. The following features were recorded for each patient, so that they could be correlated with the microbial findings: tooth type, clinical symptoms, presence or absence of a sound coronal restoration (i.e. a permanent restoration that clinically and radiographically appeared sealed), caries, sinus, swelling of periodontal tissues, tenderness to percussion, mobility, periodontal status of the tooth, status of the root canal in terms of whether dry or wet (the term 'wet canal' in this study means presence of exudate), and the radiographic quality of the root-canal filling. Coronal restorations were categorized as defective if there were open margins, fracture or recurrent decay. Initial root fillings were classified as good if no voids were present and were within 2 mm of the radiographic apex. If one or more of these criteria were not met, these were classified as poor (Ray & Trope 1995).

Sampling procedure

All coronal restorations, posts and carious defects were removed. After access cavity preparation, the teeth were individually isolated from the oral cavity with a rubber dam, and disinfected with 5.25% sodium hypochlorite. The solution was inactivated with 5% sodium thiosulphate in order to avoid interference with bacteriological sampling. Aseptic techniques were used throughout root-canal treatment and sample acquisition. In each case, a single root canal was sampled in order to confine the microbial evaluation to a single ecological environment. In multirrooted teeth, the root with the periapical lesion was selected. If there were periapical lesions in all roots, the wider canal was selected. The root filling was removed using Gates–Glidden drills (Dentsply

Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and endodontic files without the use of chemical solvents. Irrigation with sterile saline solution was performed in order to remove any remaining materials and to moisten the canal prior to sample collection.

For microbial sampling, a sterile paper point was introduced into the full length of the canal (as determined with a preoperative radiograph), and kept in place for 60 s. In the cases that had been previously irrigated with saline, as many paper points as possible were used to absorb all liquid or fluid inside the canal. The canal orifice was flushed with nitrogen gas during sampling. The paper point samples from the root canal were transferred immediately to a transport medium – VMGA III (Möller 1966, Dahlén *et al.* 1993) and transported within 15 min to an anaerobic workstation (Don Whitley Scientific, Bradford, UK) in the microbiology laboratory. The average time between sample collection and laboratory processing was 4 h.

Microbial isolation

Inside the anaerobic workstation, the transport media, containing glass beads with a diameter of 3 mm to facilitate mixing and homogenization of the sample, were shaken thoroughly in a mixer for 60 s (Agitador MA 162-MARCONI, São Paulo, SP, Brazil). Serial 10-fold dilutions were made up to $1/10^4$ in fastidious anaerobe broth (FAB, Laboratory M, Bury, UK) and 50 µL of each serial dilution were plated onto several media using sterile plastic spreaders.

Obligate anaerobes and facultative anaerobes were cultured nonselectively on plates containing 5% defibrinated sheep blood–fastidious anaerobe agar (FAA, Laboratory M, Bury, UK) incubated at 37 °C in an atmosphere of 10% H₂, 10% CO₂ and 80% N₂ for 2, 5 and 14 days. Selecting for Gram-positive anaerobes and actinomycetes involved the use of a 5% defibrinated sheep blood-FAA + nalidixic acid (NAL, 0.001% w/v, Laboratory M, Bury, UK) agar plate at 37 °C anaerobically, for 2, 5 and 14 days. Selecting for Gram-negative anaerobes involved the use of a 5% defibrinated sheep blood-FAA + vancomycin (VAN, 0.00025% w/v, Laboratory M, Bury, UK) agar plate at 37 °C anaerobically, for 2, 5 and 14 days. Selection for clostridia and other anaerobes involved the use of a 5% blood-FAA + neomycin (NEO, 0.00075% w/v neomycin, Laboratory M, Bury, UK) agar plate at 37 °C anaerobically, for 2, 5 and 14 days.

To detect aerobes and facultative anaerobes the samples were inoculated onto 5% defibrinated sheep blood-

Columbia agar plates and incubated aerobically at 37 °C for 2 days.

After incubation, each plate was examined and the different colony types subcultured onto plates to obtain pure culture. The colonial appearance was used for selecting the colonies for further study. Pure cultures were then initially identified according to their Gram morphology, ability to produce catalase and gaseous requirements.

Gaseous requirements were determined as follows: each colony obtained by anaerobic incubation was used to inoculate two plates of 5% sheep blood Columbia agar. One was incubated for 2 days aerobically and the other for the same length of time anaerobically. The respective plates were then compared. Strict anaerobes were those which are able to grow only under strictly anaerobic conditions.

These procedures permit the primary identification of the strain as Gram-positive or -negative, coccus or bacillus, catalase-positive or -negative, and aerobic and anaerobic. Based on these primary results, the appropriate kit for identification was selected.

Microbial species determination

The following identification kits were used for primary speciation of individual isolates: Rapid ID 32 A (Bio Merieux, Marcy-l'Étoile, France) for obligate anaerobic Gram-negative and -positive rods; RapID ANA II System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA, USA) for obligate anaerobic Gram-positive cocci; API Staph (Bio Merieux, Marcy-l'Étoile, France) for staphylococci and micrococci (Gram-positive cocci, catalase-positive); Rapid ID 32 Strep (Bio Merieux, Marcy-l'Étoile, France) for streptococci (Gram-positive cocci, catalase-negative); Rapid NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA, USA) for *Eikenella*, *Haemophilus*, *Neisseria* and *Actinobacillus*.

These kits are based on distinct biochemical tests (enzymatic reactions). Each kit, therefore comprises rows of individual cupules (each containing a different substrate) to which inoculum is added. After a period (4 h for most species but 18 h for *Staphylococcus* spp.) of incubation, and subsequent addition of the reagents, precipitation or colour changes appear in individual cupules. Typically, a positive test is observed as a colour change when a chromogenic substrate in an individual cupule is hydrolysed and liberates a coloured product. The results were read visually and identification of the strains was interpreted with the Analytical Profile Index.

For the black-pigmenting Gram-negative anaerobes, the following additional tests were also performed: (a) fluorescence under long-wave (366 nm) UV light; (b) haemagglutination of 3% sheep erythrocytes; (c) lactose fermentation – by application of the fluorogenic substrate 4-methylumbelliferyl- β -galactoside (Sigma Chemical Co., St Louis, MO-M-1633), according to Alcoforado *et al.* (1987); and (d) trypsin-like activity by application of the synthetic fluorogenic peptide 7-(N-carbobenoxylglycylglycylarginin-7-amido)-4-methyl coumarin hydrochloride (C-9396) (Nakamura *et al.* 1984, Slots 1987).

Statistical analysis

The data collected for each case (clinical and radiographic features, and the bacteria isolated) were entered into a spreadsheet (QUATTRO Pro, Borland International Inc., Scotts Valley, CA, USA) and analysed statistically using SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). The Pearson chi-square test or the one-sided Fisher's exact test, as appropriate, was chosen to test the null hypothesis that there was no relationship between: (a) clinical symptoms (pain or history of pain), clinical signs (sinus, swelling, canal exudate, tenderness to percussion), presence and quality of coronal restorations, quality of the previous endodontic treatment; and (b) the presence of any particular species of bacteria in previously root-treated canals.

Results

Forty-seven teeth were single-rooted and 13 multirrooted. Five patients presented for treatment with acute pain. The remainder had no spontaneous pain, although 20 gave a history of previous pain. Tenderness to percussion was present in 20 teeth and a sinus tract was detected in five patients. Thirty-seven teeth were restored with a permanent coronal restoration, 22 of which were defective and 15 sound. Ten teeth were restored with temporary restorative materials showing breakdown or fracture, and 13 had no restorations. Previous gutta-percha fillings were present in all teeth. Upon radiographic examination, 22 teeth had good root fillings, whilst 38 had poorly obturated canals.

One hundred and eight cultivable isolates belonging to 37 different species (Table 1) were recovered from the 60 root canals examined after root filling removal. Nine (15%) root canals had no cultivable bacteria; 28 (46.7%) cases presented a single microorganism, in 18 of them *Enterococcus faecalis* was the only microorganism isolated from the canal; 8 (13.3%) cases presented

Table 1 Microorganisms found in 60 canals after removal of the root filling

Microbial species	No. of root canals	Percentage of root canals
<i>E. faecalis</i>	27	45
<i>E. faecium</i>	1	1.7
<i>S. constellatus</i>	5	8.3
<i>S. sanguis</i>	4	6.7
<i>S. mitis</i>	2	3.3
<i>S. anginosus</i>	2	3.3
<i>S. mutans</i>	1	1.7
<i>S. oralis</i>	1	1.7
<i>S. salivarius</i>	2	3.3
<i>P. prevotii</i>	6	10.0
<i>P. micros</i>	5	8.3
<i>P. magnus</i>	1	1.7
<i>P. saccharolyticus</i>	1	1.7
<i>A. naeslundii</i>	4	6.7
<i>A. odontolyticus</i>	3	5
<i>A. viscosus</i>	3	5
<i>Prevotella buccae</i>	3	5
<i>P. intermedia/nigrescens</i>	3	5
<i>P. melaninogenica</i>	1	1.7
<i>P. corporis</i>	2	3.3
<i>P. loeschii</i>	1	1.7
<i>Propioni. acnes</i>	4	6.7
<i>P. propionicum</i>	1	1.7
<i>Gemella morbillorum</i>	4	6.7
<i>Veillonella</i> spp.	4	6.7
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	1	1.7
<i>F. nucleatum</i>	1	1.7
<i>Fusobacterium</i> spp.	1	1.7
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	2	3.3
<i>S. lentus</i>	2	3.3
<i>Haemophilus aphrophilus</i>	1	1.7
<i>Eubacterium lentum</i>	1	1.7
<i>Bifidobacterium</i> spp.	1	1.7
<i>Clostridium subterminale</i>	1	1.7
<i>Lactococcus lactis cremoris</i>	1	1.7
<i>Coprocoryphaga</i> spp.	1	1.7
<i>Candida</i> spp.	2	3.3

two species and 15 (25%) were polymicrobial infections consisting of three or more species per canal. The clinical and radiographic features and microbial findings of each case are presented in Table 2.

Facultative anaerobes accounted for 57.4% of all species isolated, and obligate anaerobes accounted for 42.6%. There was a predominance of Gram-positive species (83.3%). The prevalence of bacterial genera found in the 60 root canals is shown in Fig. 1. *E. faecalis* was the bacterial species most frequently recovered, being found in 27 (52.94%) of the 51 canals with bacteria, 18 times in pure culture.

Clinical features were present in teeth associated with 60 canals as follows: spontaneous pain (5/60), history

Table 2 Clinical and radiographic features and bacterial findings

Case no.	T	TAT	R	P	HP	TTP	Sw	PR	W/D	Si	RCF	Bacteria
1	22	>4	NR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>S. sanguis</i>
2	41	>4	TR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>S. sanguis</i>
3	32	12	TR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	-
4	12	20	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>S. salivarius</i>
5	22	>2	TR	N	N	N	N	Y	W	Y	PE	<i>S. mitis</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>A. naeslundii</i>
6	15	8	GR	Y	Y	N	Y	W	N	PE	PE	<i>P. micros</i> , <i>P. prevotii</i>
7	14	>4	TR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	-
8	11	>4	NR	Y	Y	N	Y	D	N	GE	PE	<i>P. saccharolyticus</i>
9	46	>4	GR	N	N	N	N	Y	W	N	PE	<i>Propioni. acnes</i> , <i>E. faecalis</i>
10	22	>4	TR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	-
11	45	5	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	-
12	11	>4	GR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>P. buccae</i> , <i>P. micros</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>E. faecalis</i>
13	21	9	NR	Y	Y	N	Y	W	N	PE	PE	<i>P. intermedia</i> , <i>P. melaninogenica</i> , <i>P. caipora</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>P. prevotii</i> , <i>P. magnus</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. lentus</i>
14	45	>4	NR	Y	Y	Y	N	Y	W	N	GE	<i>Veillonella</i> spp., <i>S. mutans</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>Candida</i> spp.
15	31	15	PR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	-
16	22	>2	GR	N	N	Y	N	Y	D	N	PE	<i>S. mitis</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>G. morbillorum</i>
17	44	5	GR	Y	Y	Y	Y	Y	D	N	GE	-
18	13	10	PR	N	Y	Y	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
19	46	>2	NR	N	Y	Y	N	Y	W	N	PE	<i>P. buccae</i> , <i>P. loeschii</i> , <i>A. naeslundii</i>
20	12	5	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
21	12	20	PR	N	Y	N	N	Y	D	Y	PE	<i>Fusobacterium</i> spp., <i>S. oralis</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>G. morbillorum</i>
22	12	>2	TR	N	N	Y	N	Y	D	N	PE	<i>Veillonella</i> spp., <i>P. prevotii</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>G. morbillorum</i> , <i>S. lentus</i> , <i>H. aphrophilus</i>
23	37	20	PR	N	N	Y	N	Y	D	N	GE	<i>E. faecalis</i>
24	32	5	GR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>P. prevotii</i>
25	22	5	PR	N	Y	Y	N	Y	D	N	GE	<i>E. faecalis</i>
26	12	10	PR	N	Y	Y	N	Y	D	Y	PE	<i>P. prevotii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. sanguis</i>
27	21	10	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
28	15	>4	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>S. constellatus</i>
29	11	10	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
30	22	10	PR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	-
31	21	5	NR	N	Y	Y	N	Y	D	Y	GE	<i>S. constellatus</i>
32	46	7	NR	N	N	Y	N	Y	D	N	PE	<i>Propioni. acnes</i> , <i>S. constellatus</i> , <i>Streptococcus</i> spp.
33	46	>4	TR	Y	Y	Y	N	Y	D	Y	PE	<i>P. intermedia</i> , <i>P. micros</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>A. naeslundii</i> , <i>Streptococcus</i> spp.
34	45	7	TR	N	Y	N	N	Y	D	N	GE	<i>P. buccae</i> , <i>P. micros</i> , <i>P. prevotii</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>E. faecalis</i>
35	37	5	PR	N	Y	Y	N	Y	D	N	GE	<i>E. faecalis</i>
36	11	8	PR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	<i>Veillonella</i> spp., <i>A. odontolyticus</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>G. morbillorum</i>
37	35	>4	GR	N	N	Y	N	Y	D	N	PE	<i>A. viscosus</i>
38	22	6	NR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>Propioni propionicum</i> , <i>Veillonella</i> spp., <i>A. naeslundii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Candida</i> spp.
39	11	8	NR	N	Y	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>

P. Parthasarathy et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth

Table 2 continued

Case no.	T	TAT	R	P	HP	TTP	Sw	PR	W/D	Si	RCF	Bacteria
40	33	30	PR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	-
41	21	12	TR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
42	23	5	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
43	45	5	NR	N	Y	N	N	Y	D	N	GE	<i>S. argininosus, Capnocytophaga</i> spp.
44	32	30	PR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	<i>E. faecalis</i>
45	42	30	PR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	<i>E. faecalis</i>
46	37	4	PR	N	Y	Y	N	Y	D	N	GE	<i>P. intermedia, E. faecalis</i>
47	21	5	TR	N	Y	N	N	Y	D	N	GE	<i>E. faecalis, Lact. lactis cremoris</i>
48	34	12	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
49	22	5	GR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
50	12	15	GR	N	Y	Y	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
51	21	11	GR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
52	11	11	GR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis</i>
53	14	11	NR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>A. odontolyticus, S. salivarius</i>
54	46	>4	GR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>P. coarctus, P. micros, Propioni. acnes</i>
55	47	>4	GR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>E. faecalis, S. sanguis</i>
56	24	3	NR	N	N	Y	N	Y	D	N	GE	<i>E. faecalis</i>
57	12	6	GR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	<i>Propioni. acnes</i>
58	45	5	NR	N	N	N	N	Y	D	N	GE	<i>S. constellatus, E. faecium</i>
59	41	8	PR	N	N	N	N	Y	D	N	PE	<i>C. subterminale</i>
60	46	>2	GR	N	Y	Y	N	Y	D	N	PE	-

Abbreviations used: T, tooth; TAT, time after treatment (years); R, restoration; GR, good restoration; PR, poor restoration; TR, temporary restoration; NR, no restoration; P, pain; HP, history of pain; TTP, tenderness to percussion; Sw, swelling; PR, periapical radiolucency; W, wet canal; D, dry canal; Si, sinus tract; RCF, root canal filling; GE, good endodontic filling; PE, poor endodontic filling; Y, yes; and N, no.

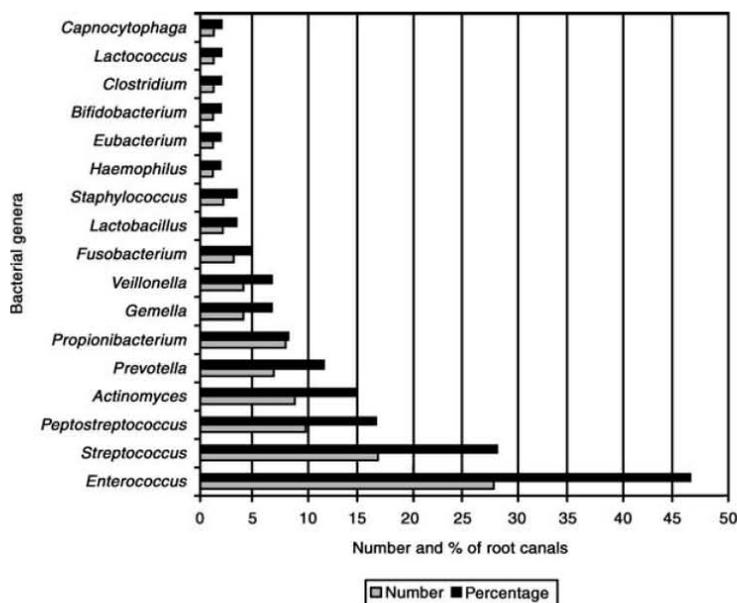


Figure 1 Prevalence of bacterial genera found in 60 teeth with failed endodontic treatment.

of pain (20/60), tenderness to percussion (20/60), sinus (5/60), swelling (1/60) and wet canal (5/60). Root-filled teeth with pain or history of pain were associated with the presence of polymicrobial infections and anaerobes ($P < 0.05$), including *Prevotella* spp. (especially *P. intermedia/P. nigrescens*) and *Fusobacterium* spp. ($P < 0.05$). Spontaneous pain was especially associated with the isolation of *Peptostreptococcus* spp. ($P < 0.01$). Tenderness to percussion was observed in 20 root canals and was associated with *P. intermedia/P. nigrescens* ($P < 0.05$). Five cases of sinus were associated with the findings of *Streptococcus* spp. ($P < 0.001$) and *Actinomyces* spp. ($P < 0.01$), especially *A. naeslundii* ($P < 0.001$). Coronally unsealed teeth showed a significant association with *Streptococcus* spp. ($P < 0.01$) and *Candida* spp. ($P < 0.01$).

There were no significant relationships between the radiographic status of the endodontic treatment and the presence of any particular species of bacteria ($P > 0.05$). However, poorly obturated canals were found to be associated with polymicrobial infections ($P < 0.05$).

Discussion

In the present study, microorganisms were recovered from 51 of the 60 teeth examined. The finding that 15% of root canals had no cultivable bacteria was not entirely unexpected; earlier studies were unable to isolate bacteria from 55.6% (Sundqvist *et al.* 1998), 26.6% (Molander *et al.* 1998), 20% (Peciulienė *et al.* 2000) and 17.5% (Peciulienė *et al.* 2001) of teeth where chloroform was not used to dissolve the gutta-percha. However, failure to detect bacteria does not prove their absence. Although the sampling techniques and laboratory procedures used in this study have been previously shown to be highly effective (Gomes *et al.* 1994, 1996a,b,c; Gomes 1995), it is possible that some microorganisms could have been lost, especially if the number of microorganisms present in the root canal was very low or if they were present in inaccessible areas such as anatomical branches and apical areas obliterated by the previous treatment. Furthermore, some microorganisms could have been removed together with the previous root filling and debris (Sundqvist *et al.* 1998).

The results showed that amongst the 51 teeth with positive culture, 28 cases presented a single species, 8 cases presented two species, and 15 cases presented polymicrobial infections consisting of 3 or more species per canal. These findings agree with those reported by Sundqvist *et al.* (1998) who found monoinfections in 19 of 24 teeth with bacteria. The same authors suggested that teeth with poor root-canal treatment are more likely to have a flora similar to that found in untreated canals than the teeth with apparently well-cleaned canals. The present investigation involved teeth with good and poor root-canal fillings, and showed a significant association between poorly obturated canals and polymicrobial infections ($P < 0.05$). It also involved symptomatic or asymptomatic teeth, and again polymicrobial infections were associated with spontaneous pain or history of pain ($P < 0.05$).

Of the total bacterial species isolated, 57.4% were facultative anaerobes and 83.3% Gram-positive species. This finding is in accordance with earlier studies by Sundqvist *et al.* (1998) and Molander *et al.* (1998), who found 58 and 69% facultative anaerobes and 87 and 74.3% Gram-positive microorganisms, respectively. In the present study, the facultative anaerobic genera most frequently isolated were *Enterococcus*, *Streptococcus* and *Actinomyces*, in agreement with previous findings (Sundqvist *et al.* 1998).

Obligate anaerobes accounted for 42.6% of the species and the most frequently isolated genera was *Peptostreptococcus*, which was significant associated with clinical symptoms. *Prevotella* spp. (especially *P. intermedia/P. nigrescens*) and *Fusobacterium* spp. were frequently isolated from canals of root filled teeth with pain or history of pain. *P. intermedia/P. nigrescens* was associated with tenderness to percussion. Several studies investigating the microbiology of primary infected root canals also reported a relationship between the presence of anaerobes with clinical symptoms, whilst oral streptococci and enteric bacteria were frequently isolated from asymptomatic teeth (Yoshida *et al.* 1987, Baumgartner 1991, Gomes *et al.* 1994, 1996a).

The presence of a sinus tract was associated with either *Streptococcus* spp. or *Actinomyces* spp., especially *A. naeslundii*. In all but one case the root canals had a mixed flora. Anaerobes belonging to *Prevotella*, *Peptostreptococcus* and *Fusobacterium* species and also facultative anaerobes such as *E. faecalis* were also isolated. Gomes *et al.* (1994, 1996a) also found that the microbiota present in teeth with a sinus was predominantly mixed.

Facultative anaerobic and Gram-positive bacteria, such as *Enterococcus*, *Streptococcus* and *Actinomyces*,

are more resistant to instrumentation and to antiseptic agents, and therefore can be expected to persist more frequently in the root canal after inadequate root-canal preparation and obturation (Cavalleri *et al.* 1989, Gomes *et al.* 1996c, Molander *et al.* 1998). Persisting microorganisms or their products can maintain an infectious process and cause treatment failure. According to Molander *et al.* (1998), facultative anaerobes can survive in a quiescent phase with low metabolic activity for a period of time, and factors such as coronal leakage can change the nutritional conditions and contribute to bacterial growth.

E. faecalis was the bacterial species most frequently recovered, being found in 52.94% of canals with bacterial growth. This finding agrees with those reported by Molander *et al.* (1998) and Sundqvist *et al.* (1998) who, respectively, found *E. faecalis* in 47 and 38% of previously root-treated canals with positive culture. Peciuliene *et al.* (2000, 2001) reported a higher isolation frequency of this microorganism: 70 and 64%, respectively.

In the present study, *E. faecalis* was isolated in pure culture in 18 of the 27 cases where this species was present. Peciuliene *et al.* (2000, 2001), respectively, isolated this microorganism in pure culture in 5 of 14 cases and in 11 of 21 teeth. Studies have shown the pathogenicity of this species in monoculture (Fabricius *et al.* 1982). *E. faecalis* has demonstrated the capacity to survive in an environment in which there are scant available nutrients and in which commensality with other bacteria is minimal (Sundqvist *et al.* 1998). It has been postulated that a virulence factor of *E. faecalis* in failed endodontically treated teeth may be related to the ability of *E. faecalis* cells to maintain the capability to invade dentinal tubules and adhere to collagen in the presence of human serum (Love 2001).

E. faecalis makes up a small percentage of the flora in the original infection and may be favoured by the changed ecology in the root canal and establish infections which are difficult to treat (Engström 1964, Goldman & Pearson 1969, Cavalleri *et al.* 1989, Sundqvist 1992a). Gomes *et al.* (1996c) showed that *E. faecalis* was more frequently recovered from the canals in later appointments after biomechanical treatment procedures. Sundqvist *et al.* (1998) reported that from nine cases in which *E. faecalis* was isolated in initial samples during root-canal re-treatment, five root canals contained this bacterial species after cleaning and shaping and the use of calcium hydroxide as medicament. Molander *et al.* (1998) suggested that the use of calcium hydroxide as an intracanal dressing may be one of the reasons for selection of *E. faecalis* in root canals, as these bacteria are able to

survive high pH values (Byström *et al.* 1985, Haapasalo & Orstavik 1987), and could have a negative impact on the prognosis. However, Peciuliene *et al.* (2000) found a high frequency of *E. faecalis* in teeth in which calcium hydroxide was not used for treatment, indicating that, rather than previous chemical treatment, it is the ecological condition of the incompletely filled root canal that is important for the presence of this microorganism.

According to Siren *et al.* (1997), *Enterococcus* spp. and other enteric bacteria may enter the root canal during treatment owing to inadequate isolation of the working area, leakage of the temporary filling or in cases where the root canal had been incorrectly left open for drainage. The same study showed that the number of failed cases was significantly higher in teeth that harboured enteric bacteria than in teeth that harboured nonenteric-bacteria.

As the root-canal treatment of the teeth investigated in this study were carried out by unknown operators, microbial samples were not collected before root-canal filling. Therefore, it is not possible to determine whether the microorganisms recovered had persisted after prior root-canal treatment, had contaminated the root canal during treatment or had invaded the root filling via coronal leakage after root-canal treatment.

In the present study, coronal leakage (by defective coronal restorations, old temporary restorative materials or coronally unsealed teeth) was detected in most of the teeth (45/60), and may have influenced the microbial findings. In the cases of absence of a coronal restoration, significant relationships were found with *Streptococcus* spp. ($P < 0.01$) and *Candida* spp. ($P < 0.01$).

Although fungi have usually not been found in the initial flora of root-canal infections, their presence is more common in persistent infections after root-canal preparation, probably as a result of contamination during treatment, or in cases of root-filled teeth with therapy-resistant periapical lesions (Nair *et al.* 1990). In the present investigation, *Candida* spp. was recovered in 2 of 60 cases. This agrees with those of Sundqvist *et al.* (1998) and Molander *et al.* (1998) who reported the presence of this microorganism in 2 of 54 teeth and in 3 of 100 teeth examined, respectively. Peciuliene *et al.* (2001) found *Candida albicans* in 6 of 40 teeth studied. Waltimo *et al.* (1999) have shown that *Candida* spp. are highly resistant to antiseptics and disinfectants commonly used as endodontic irrigants and medicaments. These microorganisms have been isolated in pure cultures from root-canal infections, a fact that may indicate that these are pathogenic in apical periodontitis (Waltimo *et al.* 1997).

Conclusion

In conclusion, the flora of canals with failure of root-canal treatment comprised a limited number of predominantly Gram-positive microbial species. Facultative anaerobes, especially *E. faecalis*, were the most commonly isolated microorganisms from teeth. However, polymicrobial infections and obligate anaerobes were frequently found in canals of symptomatic root filled teeth. This information should direct further studies at methods to eliminate infection during re-treatment, in order to improve the prognosis.

The present analysis is exploratory. It must be stressed that owing to a large number of statistical tests, it is possible that some associations are statistical artefacts. Particular relationships that have been identified will need to be corroborated with a confirmatory study. Such a study enables the construction of a more specific hypothesis and this, in turn, facilitates the employment of a multivariable method to eliminate possible confounding factors.

Acknowledgements

This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (1996/5584-3/1999/05641-5/2000/13686-8, 2000/13689-7) and CNPq (520277/99-6).

References

- Alcoforado GAP, McKay TL, Slots J (1987) Rapid method for detection of lactose fermentation oral microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology* **2**, 35–8.
- Allen RK, Newton CW, Brown CE (1989) A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases. *Journal of Endodontics* **15**, 261–6.
- Baumgartner JC (1991) Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. *Current Opinion in Dentistry* **1**, 737–43.
- Baumgartner JC, Falker WA (1991) Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *Journal of Endodontics* **17**, 380–3.
- Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae KS, Xia T (1999) Association of black-pigmented bacteria with endodontic infection. *Journal of Endodontics* **25**, 413–5.
- Byström A, Claesson R, Sundqvist G (1985) The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endodontics Dental Traumatology* **1**, 170–5.
- Cavalleri G, Cuzzolin L, Urbani G, Benoni G (1989) Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *Journal of Chemotherapy* **1**, 101–2.
- Cheung GSP (1996) Endodontic failures – changing the approach. *International Dental Journal* **46**, 131–8.

- Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, M  ller AJR (1993) A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 375–82.
- Engström B (1964) The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy* **15**, 87–106.
- Fabricius L, Dahlén G,   hman AE, M  ller AJR (1982) Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied time of closure. *Scandinavian Journal of Dental Research* **90**, 134–44.
- Fukushima H, Yamamoto K, Sagawa H, Leung KP, Walker CB (1990) Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. *Journal of Endodontics* **11**, 534–8.
- Goldman M, Pearson AH (1969) Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **28**, 897–905.
- Gomes BPFA (1995) An investigation into the root canal microflora (PhD Thesis). Manchester, UK: University of Manchester.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD (1994) Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *International Endodontic Journal* **27**, 291–8.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD (1996a) Clinical significance of dental root canal microflora. *Journal of Dentistry* **24**, 47–55.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD (1996b) Association of endodontic signs and symptoms with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal* **29**, 69–75.
- Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD (1996c) Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal* **29**, 235–41.
- Haapasalo M, Orstavik D (1987) *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of Dental Research* **66**, 1375–9.
- Hepworth MJ, Friedman S (1997) Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures. *Journal of Canadian Dental Association* **63**, 364–71.
- Ida RD, Gutmann JL (1995) Importance of anatomic variables in endodontic treatment outcomes: case report. *Endodontics and Dental Traumatology* **11**, 199–203.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **20**, 340–9.
- Lin ML, Pascon EA, Skribner J, G  ngler P, Langeland K (1991) Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* **11**, 603–11.
- Love MR (2001) *Enterococcus faecalis* – a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal* **34**, 399–405.
- Magura ME, Abdel HK, Brown CE, Newton CW (1991) Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: an *in vitro* study. *Journal of Endodontics* **17**, 324–31.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **31**, 1–7.
- M  ller AJR (1966) Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift* **74** (special issue), 1–380.
- M  ller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Ohman A, Heyden G (1981) Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* **89**, 475–84.
- Nair PNR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G (1990) Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics* **16**, 580–8.
- Nair PNR, Sjögren U, Fidgor D, Sundqvist G (1999) Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **87**, 617–27.
- Nakamura M, Mashino PA, Slots J (1984) Dipeptidyl arylamidase activity of *Bacteroides gingivalis*. *Microbiology Letters* **24**, 157–60.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M (2000) Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *Journal of Endodontics* **26**, 593–5.
- Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M (2001) Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **34**, 429–34.
- Ray HA, Trope M (1995) Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration. *International Endodontic Journal* **28**, 12–8.
- Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T (1993) Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human deciduous teeth. *Microbiological Ecology in Health and Disease* **6**, 269–75.
- Siqueira JF Jr (2001) Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International Endodontic Journal* **34**, 1–10.
- Siren EK, Haapasalo PP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ (1997) Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal* **30**, 91–5.
- Sjögren U, Fidgor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **30**, 297–306.
- Sjögren U, Hägglund B, Sundqvist G, Wing K (1990) Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *Journal of Endodontics* **16**, 498–504.
- Slots J (1987) Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescent assay for trypsin-like activity. *Oral Microbiology and Immunology* **2**, 139–41.

- Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ (1993) Factors influencing the success of conventional root canal therapy – a five-year retrospective study. *International Endodontic Journal* **26**, 321–33.
- Sundqvist G (1992a) Ecology of root canal flora. *Journal of Endodontics* **18**, 427–30.
- Sundqvist G (1992b) Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 257–62.
- Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U (1989) Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *Journal of Endodontics* **15**, 13–8.
- Sundqvist G, Fidgor D, Sjogren U (1998) Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **85**, 86–93.
- Swartz DB, Skidmore AE, Griffen JA (1983) Twenty years of endodontic success and failure. *Journal of Endodontics* **9**, 198–202.
- Takahashi K (1998) Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal* **31**, 311–25.
- Torabinejad M, Ung B, Kettering JD (1990) *In vitro* bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *Journal of Endodontics* **16**, 566–9.
- Wältimo TMT, Siren EK, Torikko HLLK, Olsen I, Haapasalo MPP (1997) Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **30**, 96–101.
- Wältimo TMT, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MPP (1999) Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide *in vitro*. *International Endodontic Journal* **32**, 94–8.
- Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H (1987) Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals with periapical pathosis. *Journal of Endodontics* **13**, 24–8.

Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions

E. T. Pinheiro¹, B. P. F. A. Gomes¹, D. B. Drucker², A. A. Zaia¹, C. C. R. Ferraz¹ & F. J. Souza-Filho¹

¹Department of Endodontic, Piracicaba Dental School, State University of Campinas, UNICAMP, Piracicaba, Brazil; and

²Department of Oral Microbiology, University Dental Hospital of Manchester, Manchester, UK

Abstract

Pinheiro ET, Gomes BPF, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal*, 37, 756-763, 2004.

Aim To test, *in vitro*, the susceptibility to different antibiotics of *Enterococcus faecalis* isolates from canals of root filled teeth with periapical lesions.

Methodology Twenty-one *E. faecalis* isolates, from canals of root filled teeth with persisting periapical lesions, were tested for their antibiotic susceptibilities. The following antibiotics were used: benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, erythromycin, azithromycin, vancomycin, chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin and moxifloxacin. Minimal inhibitory concentrations (MICs) for the antimicrobial agents were determined using the E-test System (AB BIODISK, Solna, Sweden), and the *E. faecalis* strains classified as susceptible or resistant according to the guidelines of National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). The strains were also tested for β -lactamase production with nitrocefin (Oxoid, Basingstoke, UK).

Results All strains were susceptible to penicillins *in vitro*, however, the MICs of amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid ($MIC_{90} = 0.75 \mu\text{g mL}^{-1}$) were lower than for benzylpenicillin ($MIC_{90} = 3.0 \mu\text{g mL}^{-1}$). All strains studied were also susceptible to vancomycin and moxifloxacin, whilst 95.2% were susceptible to chloramphenicol. Amongst the isolates, 85.7% were susceptible to tetracycline and doxycycline and 80.9% to ciprofloxacin. The MIC of erythromycin ranged from 0.38 to $>256 \mu\text{g mL}^{-1}$; only 28.5% of the strains were susceptible ($MIC \leq 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Limited susceptibility was also observed with azithromycin which was active against only 14.2% of isolates. No strains produced β -lactamase.

Conclusion *Enterococcus faecalis* isolates were completely susceptible, *in vitro*, to amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, vancomycin and moxifloxacin. Most isolates were susceptible to chloramphenicol, tetracycline, doxycycline or ciprofloxacin. Erythromycin and azithromycin were least effective.

Keywords: antimicrobial susceptibility, endodontic failure, *Enterococcus faecalis*.

Received 6 November 2003; accepted 9 June 2004

Introduction

Enterococci are common inhabitants of the human gastrointestinal and genitourinary tracts (Murray

1990, Morrison *et al.* 1997). They have long been known to cause infections, such as enterococcal bacteraemia (Murdoch *et al.* 2002), infective endocarditis (Graham & Gould 2002) and urinary tract infections (Murray 1990, Morrison *et al.* 1997). Over the last two decades, enterococci have been recognized as the leading cause of hospital-acquired infection, paralleling their increased antimicrobial resistance to most currently approved agents (Mundy *et al.* 2000,

Correspondence: Brenda P. F. A. Gomes, BDS, MSc, PhD, Endodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba-FOP-UNICAMP, Avenida Limeira, 901, Piracicaba, SP, 13414-018, Brazil (Tel.: 0055 19 3412-5215; fax: 0055 19 3412-5218; e-mail: bpgomes@fop.unicamp.br).

Malani et al. 2002, Udo et al. 2002). Of the enterococcal species associated with colonization and infection in humans, *Enterococcus faecalis* is the most common species (Murray 1990, Mundy et al. 2000, Shepard & Gilmore 2002).

Enterococci are also able to colonize a variety of other sites, including the oral cavity (Smyth et al. 1987). These microorganisms have been associated with oral mucosal lesions in immunocompromised patients (Wahlin & Holm 1988), periodontitis (Rams et al. 1992) and root canal infections (Molander et al. 1998, Sundqvist et al. 1998, Noda et al. 2000, Peculiene et al. 2000, 2001, Pinheiro et al. 2003a,b). Enterococci constitute a small percentage of the microbial species isolated from root canals of teeth with necrotic dental pulps (Sundqvist 1992, 1994). However, they are the most commonly isolated species from root canals of teeth with failed endodontic treatment. Enterococci are found in approximately 50% of the canals with refractory infection (Molander et al. 1998, Pinheiro et al. 2003a,b). Peculiene et al. (2000, 2001) have reported an isolation frequency of enterococci as high as 70% when root filled teeth are associated with chronic apical periodontitis. *Enterococcus faecalis* is also the most common *Enterococcus* sp. isolated from root canals; other species are rarely found (Sundqvist et al. 1998, Peculiene et al. 2000, 2001, Pinheiro et al. 2003a,b). *Enterococcus faecalis* is usually isolated in pure culture or as a major component of the flora of previously root filled teeth with chronic apical periodontitis (Peculiene et al. 2000).

Antibiotics are not generally used to treat chronic infections, such as apical periodontitis, in root filled teeth. Chronic alveolar infections are associated with pulpless teeth which have no blood supply reaching the pulp space. Following the systemic administration of an antibiotic, the concentration reaching the root canal is negligible and unlikely to inhibit bacterial growth. Therefore, systemic antibiotic therapy is neither indicated nor likely to be beneficial (Abbott et al. 1990). Prophylactic use of antibiotics is, of course, another matter. Prophylactic use can be indicated if patients are considered at risk of infective endocarditis during endodontic treatment (Abbott et al. 1990, Debelian et al. 1995). In such cases, therapy should be directed primarily against the most important pathogens present.

Furthermore, periapical abscesses can originate from root filled teeth whose apical periodontitis continues following treatment. Some of them need antibiotic therapy prior to surgical treatment (Sousa et al. 2003).

However, it is important to emphasize that, because of ecological changes in an acute situation, the microbiota will change. Polymicrobial infections and obligate anaerobes are frequently found in canals of symptomatic root filled teeth (Pinheiro et al. 2003a). Therefore, bacteria other than enterococci will often be the main target of the antibiotics in the acute infection.

Enterococci possess a vast array of mechanisms that confer antibiotic resistance to a range of antibiotics including penicillin, the drug of choice (Hoellman et al. 1998, Shepard & Gilmore 2002). These microorganisms show intrinsic resistance to certain antibiotics such as cephalosporins, clindamycin and aminoglycosides (Murray 1990, Morrison et al. 1997). In addition to these intrinsic resistances, enterococci have acquired genetic determinants that confer resistance to many classes of antimicrobials, including tetracycline, erythromycin, chloramphenicol, and, most recently, vancomycin (Murray 1990, Morrison et al. 1997, Mundy et al. 2000, Shepard & Gilmore 2002).

Clinical isolates of *E. faecalis* recovered from root canal infections can demonstrate antimicrobial resistance to conventional treatment regimens recommended for dental procedures. Dahlén et al. (2000) have described enterococcal isolates resistant to benzylpenicillin, ampicillin, clindamycin, metronidazole and tetracycline; whilst Noda et al. (2000) have discovered strains that are resistant to cephalosporins. Previous studies (Pinheiro et al. 2003b) have found *E. faecalis* strains which show resistance to azithromycin and erythromycin. Thus, many antibiotics, traditionally used in odontogenic infection, may prove ineffective against *E. faecalis* so that information on alternative agents is required.

In the case of endodontic infections associated with enterococci, very limited antibiotic sensitivity data are available. The present study aimed to test, *in vitro*, the susceptibility to different antibiotics of *E. faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions.

Materials and methods

Clinical material

The *E. faecalis* strains were isolated from canals of root filled teeth with persisting periapical lesions as described by Pinheiro et al. (2003a) and Gomes et al. (2004). Patients were selected from those who attended the Piracicaba Dental School, SP, Brazil, with a need for

nonsurgical root canal retreatment. Patients who had received antibiotic treatment during the last 3 months or had a general disease were excluded from the study.

Sampling procedure

All coronal restorations, posts and carious defects were removed. After access cavity preparation, the teeth were individually isolated from the oral cavity with a rubber dam, and disinfection was carried out using 5.25% sodium hypochlorite. The root filling was removed using Gates Glidden drills (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and endodontic files without the use of chemical solvents. Irrigation with sterile saline solution was performed in order to remove any remaining materials and to moisten the canal prior to sample collection. For microbial sampling, a sterile paper point was introduced into the full length of the canal (as determined with a preoperative radiograph), and kept in place for 60 s. The paper point samples from the root canal were transferred to a transport medium-VMGA III (Möller 1966, Dahlén et al. 1993) and taken to the microbiology laboratory for processing within 4 h.

Microbial identification

The samples were inoculated onto nonselective blood agar plates and incubated in aerobic and anaerobic conditions. The enterococcal identification was performed using colonial morphology, oxygen tolerance, Gram staining characteristics, and Rapid ID 32 Strep (Bio Merieux, Marcy-l'Etoile, France). In most of the cases, enterococcal strains, bile resistant, facultatively anaerobic Gram-positive cocci, were identified as *E. faecalis*.

Antimicrobial susceptibility tests

The susceptibility/resistance of 21 *E. faecalis* strains to 11 antibiotics was measured. The following antimicrobials were tested: benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, erythromycin, azithromycin, vancomycin, chloramphenicol, tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin and moxifloxacin.

The antimicrobial susceptibility of isolates was investigated by means of the E-test System (AB Biodisk, Solna, Sweden). The E-test uses plastic strips; one side of the strip contains a concentration gradient of the antimicrobial agent; the other contains a numeric scale

that indicates the drug concentration in $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Bolmström 1993).

Mueller-Hinton agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK) 4 mm thick were inoculated using a swab that had been submerged in a bacterial suspension standardized to match the turbidity of the 0.5 McFarland standard. The surface of the plate was swabbed in three directions to ensure a complete distribution of the inoculum over the entire plate. Within 20 min of inoculation, the antimicrobial agents' strips were applied and the plates were inverted for incubation at 35 °C in air for 16–18, 24 h for vancomycin. After incubation, the plate was examined and an elliptical zone of growth inhibition was seen around the strip. The minimal inhibitory concentration (MIC) was read from the scale on the strip at the intersection of the growth with the E-strip. Once the MICs for the antimicrobial agents had been recorded, they were translated into interpretative categories of susceptible or resistant according to the guidelines of National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002). All the tests were completed in duplicate.

Beta-lactamase production

Enterococcus faecalis isolates were tested for β -lactamase production with nitrocefin (Oxoid) according to the manufacturer's instructions. Nitrocefin solution (5 μL) was dropped onto a single colony of an overnight culture. Development of a red colour within 60 s indicated a positive result.

Results

MIC range, MIC₅₀ and MIC₉₀ values obtained by the E-test method are shown in Table 1. Susceptibility rates are also shown. All isolates proved susceptible to benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid. No strains produced β -lactamase. The strains studied were also completely susceptible to vancomycin and moxifloxacin. The latter was the most active antibiotic, *in vitro*, against *E. faecalis* with the lowest MIC values: all isolates were inhibited by $\leq 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eight strains were found to be resistant to azithromycin, and two of them were also resistant to erythromycin. Three strains were resistant to both tetracycline and doxycycline. One strain was resistant to multiple drugs, viz. erythromycin, azithromycin, tetracycline, doxycycline and chloramphenicol.

Table 1 *In vitro* susceptibility of 21 *E. faecalis* isolates from canals of root filled teeth with periapical lesions

Antibiotic	MIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			% Susceptible ^a
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Range	
Benzylpenicillin	2.0	3.0	1.0–4.0	100
Amoxicillin	0.5	0.75	0.25–0.75	100
Amoxicillin-clavulanic acid	0.5	0.75	0.25–0.75	100
Erythromycin	1.0	2.0	0.38–>256	28.6
Azithromycin	4.0	24.0	2.0–>256	14.2
Vancomycin	3.0	3.0	1.0–4.0	100
Chloramphenicol	4.0	6.0	3.0–>256	95.2
Tetracycline	0.5	32	0.19–>256	85.7
Doxycycline	0.38	12	0.12–>256	85.7
Ciprofloxacin	1.0	1.5	0.38–2.0	80.9
Moxifloxacin	0.38	0.5	0.19–0.5	100

MIC₅₀, minimal inhibitory concentration including 50% of the strains; MIC₉₀, minimal inhibitory concentration including 90% of the strains.

^aSusceptibility and resistance MIC breakpoints ($\mu\text{g mL}^{-1}$) recommended by NCCLS (2002): benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid (≤ 8 S, ≥ 16 R); erythromycin (≤ 0.5 S, ≥ 8 R); vancomycin (≤ 4 S, ≥ 32 R); chloramphenicol (≤ 8 S, ≥ 32 R); tetracycline and doxycycline (≤ 4 S, ≥ 16 R); ciprofloxacin (≤ 1 S, ≥ 4 R). The breakpoints used for azithromycin were ≤ 2 S and ≥ 8 R (Fass 1993); and for moxifloxacin were ≤ 2 S, ≥ 8 R (Mather et al. 2002).

Discussion

Penicillins are the most frequently used antimicrobial agents. Due to their historical effectiveness, minimal toxicity and relatively low cost, penicillins constitute the first-choice antibiotics for odontogenic infections. Important classes of penicillins include penicillins G and V, which are highly active against susceptible Gram-positive cocci, and amoxicillin with an improved Gram-negative spectrum. β -Lactamase inhibitors such as clavulanate are used to extend the spectrum of penicillins against β -lactamase producing organisms (Petri 2001).

Bacterial resistance to penicillins has become a problem of great clinical significance because of its widespread use for many years (Appelbaum et al. 1990). The development of enterococcal resistance to β -lactams can be mediated by alterations in the expression or binding affinities of penicillin-binding proteins. Additionally, resistance has been associated with the production of β -lactamase, occasionally (Morrison et al. 1997). However, in this study, all isolates were negative for β -lactamase production, which agrees with the findings of Udo et al. (2002). β -Lactamase production occurs only rarely in *E. faecalis*

(Murray 2000, Murdoch et al. 2002, Shepard & Gilmore 2002).

All strains studied were susceptible to penicillins *in vitro*, however, the MICs of amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid were lower than for benzylpenicillin. These findings are in agreement with previous studies (Rams et al. 1992, Pinheiro et al. 2003b) which have found that enterococci are more sensitive to amoxicillin than to benzylpenicillin, bearing in mind that the latter can be given i.m. or i.v. not orally. Phenoxymethyl penicillin, which can be given orally, is less active against enterococci than benzylpenicillin is (Nord & Wadström 1973). The results indicated that *E. faecalis* strains isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions remain susceptible, *in vitro*, to amoxicillin. Nevertheless, the lack of enterococcal resistance to penicillins in this study may be due to the limited number of strains investigated and/or geographical differences. The presence of enterococcal strains resistant to penicillin and ampicillin has been reported in endodontic infections in the USA (Matusow 1981) and Sweden (Dahlén et al. 2000) which underlines the need to perform susceptibility tests of these isolates. However, those authors did not provide information about the nature of the endodontic infections, i.e. primary or secondary infections. There most likely is a difference in resistance pattern between enterococci from primary infections and from root filled teeth with continuing apical periodontitis. Further investigation involving enterococcal strains isolated from both situations would improve knowledge about resistance pattern of enterococci in endodontic infections.

Besides differences in geographical areas and origins of infections, changes in resistance pattern of bacteria may occur over time. Earlier studies (Zeldore & Ingle 1962, Engström 1964) of enterococci isolated from root canals had shown that 100% of isolates were susceptible to erythromycin. Heintz et al. (1975) found more than 90% of isolates were susceptible, whilst Stern et al. (1990) have found 61.9% of enterococcal isolates susceptible to this drug. The present findings support the finding of a decrease in the enterococcal susceptibility to erythromycin over time. In this study, the MIC of erythromycin varied between 0.5 and $>256 \mu\text{g mL}^{-1}$. Two isolates were classified as resistant ($\text{MIC} \geq 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) and 6 (28.5%) as susceptible ($\text{MIC} \leq 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$) according to the susceptibility breakpoints determined by the NCCLS protocol; most of the isolates (65.4%) showed an intermediate pattern. Similar results have been reported by Sedgley et al.

(2004) who have found, amongst 12 oral enterococci, two strains resistant to erythromycin, two (16.6%) susceptible and eight (66.6%) with an intermediate pattern. Those studies have shown that the MIC of erythromycin, when tested against enterococcal strains, has increased over time; which suggests that oral enterococci have become less susceptible to this drug.

Azythromycin is able to achieve higher and more sustained blood levels than erythromycin, without the gastrointestinal side effects (Grad 1997, Andrade 2000). Azythromycin was tested as a substitute for erythromycin and was found to be less effective against enterococci than erythromycin, with only 14.2% of isolates being susceptible. This finding is in accordance with those of Fass (1993). Furthermore, the latter study has also reported that there is cross-resistance between azithromycin and erythromycin.

In this study, erythromycin and azythromycin resistance was found amongst *E. faecalis* isolates. Furthermore, *E. faecalis* has intrinsic resistance to clindamycin (Murray 1990, Morrison et al. 1997). Thus, this drug is not clinically effective for *Enterococcus* spp. Therefore, when patients are allergic to penicillins, the alternative prophylactic regimens recommended for dental procedures seems to be of limited value against enterococci. Due to the predominance of *E. faecalis* in root filled teeth with periapical lesions, alternative drugs should be considered for prophylaxis in individuals at risk for endocarditis during endodontic retreatment. Amongst the alternative drugs investigated in this study, *E. faecalis* strains were found to be resistant to tetracycline, doxycycline, ciprofloxacin and chloramphenicol. Owing to geographical differences as well as differences over time, previously discussed in this paper, the findings of this study are not general but rather only applicable to the microbes tested.

Tetracyclines are broad-spectrum antibiotics with activity against aerobic and anaerobic Gram-positive and Gram-negative organisms. Doxycycline is one of the most active derivative of tetracycline. However, bacterial resistance to any member of the class usually results in cross-resistance to other tetracyclines (Chambers 2001), which was observed in the present study. The strains resistant to tetracycline were also resistant to doxycycline, the latter showing lower MICs against *E. faecalis*. Tetracycline resistance observed in 14.3% of strains in this study agrees with resistance in 13.8% of isolates reported by Dahlén et al. (2000). In contrast, some studies have shown even higher percentages of *E. faecalis* to be resistant to this antibiotic, i.e. 58% (Rams et al. 1992), 65.1% (Udo et al. 2002) and 68.5%

(Cotter & Adley 2001). Resistance to tetracyclines has reduced their clinical usefulness.

Chloramphenicol is effective against most aerobes and anaerobes, but its potential side-effect of aplastic anaemia usually makes selection of another effective and safer antibiotic a better choice (Moening et al. 1989). It was effective against 95.23% of the strains in this study. However, other studies have reported that 20% (Cotter & Adley 2001) to 26% (Udo et al. 2002) of enterococci are chloramphenicol resistant.

Amongst the drugs tested, vancomycin and moxifloxacin were active against all *E. faecalis* isolates *in vitro*. Vancomycin is a drug primarily active against Gram-positive bacteria. However, it should be employed only to treat serious infections (Chambers 2001). Administration of vancomycin is an effective alternative, in patients who are allergic to penicillin, for the treatment of endocarditis caused by viridans streptococci as well as enterococci. In the latter case, penicillin or vancomycin is given in combination with an aminoglycoside (Murray 1990, Graham & Gould 2002). All *E. faecalis* strains examined in this study were susceptible to vancomycin. Previous studies of the susceptibility of oral enterococci have also shown high susceptibility to vancomycin (Rams et al. 1992, Dahlén et al. 2000). However, studies have highlighted the emergence of vancomycin-resistant enterococci, especially amongst *E. faecium* and in lower frequency amongst *E. faecalis* (Murray 2000, Malani et al. 2002). These vancomycin-resistant enterococci have emerged as major nosocomial pathogens in hospitals, and frequently possess determinants conferring multiple drug resistance so that few therapeutic options remain for treating these infections (Morrison et al. 1997, Rice 2001, Shepard & Gilmore 2002).

Moxifloxacin and ciprofloxacin are members of the quinolones. Ciprofloxacin has antimicrobial activity against most Gram-negative bacilli and cocci, but limited activity against most Gram-positive organisms. Moxifloxacin is a new fluoroquinolone with expanded spectrum of activity, including anaerobes and Gram-positive organisms, especially the multi-resistant ones (Fass 1997, Oliphant & Green 2002, Speciale et al. 2002, Andersson & MacGowan 2003). In the present study, moxifloxacin was one of the most active antibiotics against *E. faecalis* with the lowest MIC₅₀ and MIC₉₀, and proved more active than ciprofloxacin, which agrees with data that have been reported by several authors (Fass 1997, Mather et al. 2002, Speciale et al. 2002). In addition to antimicrobial activity studies, the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of moxifloxacin have been studied, showing

excellent bioavailability, long half-life and good tissue penetration of this drug. Furthermore, it has an excellent tolerability (Krasemann et al. 2001).

Recent studies have shown that moxifloxacin has good antibacterial activity against periodontal pathogens (Milazzo et al. 2002) and bacteria isolated from dentoalveolar abscesses (Sobottka et al. 2002). The latter have suggested the potential use of moxifloxacin in the treatment of odontogenic infections. This study revealed that moxifloxacin had good *in vitro* activity against *E. faecalis* isolates from the root canal and seems to be a reasonable alternative for patients who are allergic to penicillin or show resistance to the antibiotics usually prescribed. However, further investigation involving a larger number of bacterial isolates from root canal as well as clinical studies would be necessary to test the use of moxifloxacin as an alternative drug when antibiotic therapy is indicated during endodontic treatment.

Conclusion

In conclusion, the results have shown that amoxicillin, amoxicillin-clavulanic acid, vancomycin and moxifloxacin were the most active antibiotics, *in vitro*, against *E. faecalis*, with all the isolates being susceptible. Less effective were chloramphenicol, tetracycline, doxycycline and ciprofloxacin, which were effective against most strains. Azithromycin and erythromycin were least effective, with low percentages of isolates being susceptible, during laboratory testing. Owing to geographical differences as well as differences over time, the findings of this study are not general but rather only applicable to the microbes tested.

Acknowledgements

We would like to thank Mr Adailton dos Santos Limas for technical support. This work was supported by the Brazilian agencies FAPESP (2000/13686-8, 2000/13689-7) and CNPq (520277/99-6).

References

- Abbott PV, Hume WR, Pearman JW (1990) Antibiotics and endodontics. *Australian Dental Journal* **35**, 50–60.
- Andersson ML, MacGowan AP (2003) Development of the quinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**(Suppl. 1), 1–11.
- Andrade ED (2000) *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. São Paulo, SP, BR: Artes Médicas.
- Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR (1990) β -lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides* isolates and 129 fusobacteria from 28 US centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **34**, 1546–50.
- Bolmström A (1993) Susceptibility testing of anaerobes with E-test. *Clinical Infectious Diseases* **16**(Suppl. 4), S367–70.
- Chambers HF (2001) Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edn. New York, USA: McGraw-Hill, pp. 1239–72.
- Cotter G, Adley CC (2001) Comparison and evaluation of antimicrobial susceptibility testing of enterococci performed in accordance with six national committee standardized disk diffusion procedures. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3753–6.
- Dahlén G, Pipattanagovit P, Rosling B, Möller AJR (1993) A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology* **8**, 375–82.
- Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C (2000) Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiology and Immunology* **15**, 309–12.
- Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L (1995) Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endodontics and Dental Traumatology* **11**, 142–9.
- Engström B (1964) The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy* **15**, 87–104.
- Fass RJ (1993) Erythromycin, clarithromycin, and azithromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare *in vitro* activities and describe cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 2080–6.
- Fass RJ (1997) *In vitro* activity of bay 12-8039, a new 8-methoxyquinolone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41**, 1818–24.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR et al. (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 71–6.
- Grad HA (1997) Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omega* **90**, 64–72.
- Graham JC, Gould FK (2002) Role of aminoglycosides in the treatment of bacterial endocarditis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 437–44.
- Heintz CE, Deblinger R, Oilet S (1975) Antibiotic sensitivities of enterococci isolated from treated root canals. *Journal of Endodontics* **1**, 373–6.
- Hoellman DB, Visalli MA, Jacobs MR, Appelbaum PC (1998) Activities and time-kill studies of selected penicillins, β -lactamase inhibitor combinations, and glycopeptides against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 857–61.

- Krasemann C, Meyer J, Tilloston G (2001) Evaluation of the clinical microbiology profile of moxifloxacin. *Clinical Infectious Diseases* **32**(Suppl. 1), S51–63.
- Malani PN, Thal L, Donabedian SM et al. (2002) Molecular analysis of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* from Michigan hospitals during a 10 year period. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 841–3.
- Mather R, Karenchak L, Romanowski EG, Kowalski RP (2002) Fourth generation fluorquinolones: new weapons in the arsenal of ophthalmic antibiotics. *American Journal of Ophthalmology* **133**, 463–6.
- Matusow RJ (1981) Acute-alveolar cellulitis syndrome. Part II. Clinical assessment of antibiotic effectiveness against microbes isolated from intact teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **52**, 187–96.
- Milazzo I, Blandino G, Musumeci R, Nicoletti G, Lo Bue AM, Speciale A (2002) Antibacterial activity of moxifloxacin against periodontal anaerobic pathogens involved in systemic infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **20**, 451–6.
- Moening JE, Nelson CL, Kohler RB (1989) The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery* **47**, 976–85.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **31**, 1–7.
- Möller AJR (1966) Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Odontologisk Tidskrift* **74** (Special Issue), 1–380.
- Morrison D, Woodford N, Cookson B (1997) Enterococci as emerging pathogens of humans. *Society for Applied Bacteriology Symposium Series* **26**, 89S–99S.
- Mundy LM, Saham DF, Gilmore M (2000) Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews* **13**, 513–22.
- Murdoch DR, Mirrett S, Harrell LJ, Monahan JS, Reller LB (2002) Sequential emergence of antibiotic resistance in enterococcal bloodstream isolates over 25 years. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3676–8.
- Murray BE (1990) The life and times of the enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews* **3**, 46–65.
- Murray BE (2000) Drug therapy: vancomycin-resistant enterococcal infections. *The New England Journal of Medicine* **342**, 710–21.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002) Minimal inhibitory concentration (MIC) breakpoints for *Enterococcus* spp. M100-S12. NCCLS **22**, 56–8.
- Noda M, Komatsu H, Inoue S, Sano H (2000) Antibiotic susceptibility of bacteria detected from the root canal exudate of persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics* **26**, 221–4.
- Nord CE, Wadström T (1973) Susceptibility of haemolytic oral enterococci to eight antibiotics in vitro. *Acta Odontologica Scandinavica* **31**, 395–9.
- Oliphant CM, Green GM (2002) Quinolones: a comprehensive review. *American Family Physician* **65**, 455–64.
- Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M (2000) Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *Journal of Endodontics* **26**, 593–5.
- Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M (2001) Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **34**, 429–34.
- Petri Jr WA (2001) Antimicrobial agents: penicillins, cephalosporins and other β -lactam antibiotics. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edn. New York, USA: McGraw-Hill, pp. 1189–218.
- Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003a) Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal* **36**, 1–11.
- Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2003b) Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology* **18**, 100–3.
- Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J (1992) Enterococci in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 249–52.
- Rice LB (2001) Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 183–7.
- Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB (2004) Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 95–101.
- Shepard BD, Gilmore MS (2002) Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. *Microbes and Infection* **4**, 215–24.
- Smyth CJ, Matthews H, Halpenny MK, Brandis H, Colman G (1987) Biotyping, serotyping and phage typing of *Streptococcus faecalis* isolated from dental plaque in the human mouth. *Journal of Medical Microbiology* **23**, 45–54.
- Sobotka I, Cachovan G, Sturenburg E et al. (2002) In vitro activity of moxifloxacin against bacteria isolated from odontogenic abscesses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 4019–21.
- Sousa ELR, Ferraz CCR, Gomes BPFA, Pinheiro ET, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2003) Bacteriologic study of root canals with periapical abscesses. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **96**, 332–9.
- Speciale A, Musumeci R, Blandino G, Milazzo I, Caccamo F, Nicoletti G (2002) Minimal inhibitory concentrations and time-kill determination of moxifloxacin against aerobic and anaerobic isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents* **19**, 111–8.
- Stern MH, Dreizen S, Ott T, Levy BM (1990) Analysis of positive cultures from endodontically treated teeth: a

- retrospective study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **69**, 366–71.
- Sundqvist G (1992) Ecology of the root canal flora. *Journal of Endodontics* **18**, 427–30.
- Sundqvist G (1994) Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **78**, 522–30.
- Sundqvist G, Fidgor D, Sjogren U (1998) Microbiology analysis of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **85**, 86–93.
- Udo EE, Al-Sweih N, John P, Chug TD (2002) Antibiotic resistance of enterococci isolated at a teaching hospital in Kuwait. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **43**, 233–8.
- Wahlin YB, Holm AK (1988) Changes in the oral microflora in patients with acute leukemia and related disorders during the period of induction therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **65**, 411–7.
- Zeldore BJ, Ingle JI (1962) Management of periapical infection: antibiotic sensitivity of bacteria isolated from root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **15**, 721–6.