



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que a aluna Bárbara Trindade Di Santi (RA 101605) esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico" no ano de 2013.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 01 de Agosto de 2013.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**



CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE CANAIS RADICULARES DE DENTES
COM INSUCESSO ENDODÔNTICO**

BÁRBARA TRINDADE DI SANTI

Piracicaba – SP

2013

BÁRBARA TRINDADE DI SANTI

**AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE CANAIS RADICULARES DE DENTES
COM INSUCESSO ENDODÔNTICO**

ORIENTADORA: PROF.^a DR.^a BRENDA PAULA F. DE A. GOMES
CO-ORIENTADORES: MARLOS BARBOSA RIBEIRO E MARCOS SERGIO ENDO

Piracicaba – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Di Santi, Bárbara Trindade, 1991-

D63a Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas
de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico /
Bárbara Trindade Di Santi. - Piracicaba, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade
Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Endodontia. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida- II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de
Piracicaba. III. Título.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, que me deu o dom da vida e a dádiva da sabedoria em tomar as decisões corretas e, com sua proteção, ter conseguido concluir esse trabalho.

À minha amada mãe, Maria Lúcia Trindade Di Santi, meu exemplo de vida, por ter me ensinado que o estudo é o único bem que ninguém pode nos tomar, me incentivando e motivando a seguir atrás dos meus sonhos.

Ao meu pai, Gilberto Wilian Di Santi, por me mostrar todos os dias que não há Glória sem luta, por sua dedicação e determinação em cuidar de nossa família, que foi a minha base.

À minha irmã, Bianca Trindade Di Santi, a outra parte de mim nesse mundo, que apesar de nossas diferenças, sempre esteve ao meu lado quando precisei.

Ao meu namorado, Gustavo Furlan, pela compreensão nesse momento em que não pude estar presente, por sempre me motivar e apoiar dizendo que no final tudo dá certo, e por me mostrar o quão maravilhosa a vida pode ser.

À minha amiga-irmã, Hortência M. Xavier de Sousa, que se tornou a minha família em Piracicaba, por toda a amizade, companheirismo e fidelidade mostrados durante esses 4 anos de graduação e por todos os momentos que passamos juntas, que foram inesquecíveis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora, a Prof.^a Dr.^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, por ter acreditado em mim e no meu trabalho, se mostrando sempre disposta em transmitir seus conhecimentos para a conclusão do mesmo. Muito obrigada pela paciência, dedicação e pela dádiva de ser sua orientada.

Agradeço ao meus co-orientadores, o Mestrando Marlos Barbosa Ribeiro, por ter me socorrido em um momento difícil e ter abraçado a minha causa, me ajudando, orientando, transmitindo toda a sua experiência e por ter sido um verdadeiro amigo. Meus sinceros agradecimentos por você ter sido essa pessoa com esse coração enorme. Ao Prof. Dr. Marcos Sergio Endo, por ter me inspirado em minha pesquisa, me ensinando a trabalhar no laboratório e por ter feito eu me apaixonar pela Endodontia.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, nas pessoas do diretor Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior e do diretor associado Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia.

A todos os professores de Endodontia da FOP-UNICAMP, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, Profa. Dra. Brenda P F A Gomes, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho e Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida.

A todos os meus colegas de graduação, que sem dúvida, dividiram comigo os melhores anos da minha vida.

RESUMO

Muitas bactérias, clinicamente importantes, são capazes de adquirir e expressar resistência a agentes antimicrobianos comumente usados para tratar infecções, o que torna necessário, em determinadas situações, a realização de testes laboratoriais para detectar a resistência ou suscetibilidade antimicrobiana desses microrganismos. **Objetivo:** avaliar a suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. **Métodos:** Cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* (n=3), *Enterococcus faecium* (n=3), *Actinomyces viscosus* (n=3) e *Staphylococcus aureus* (n=3) coletadas in vivo de canais radiculares com insucesso endodôntico serão testadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana por meio do método E-test em duplicata, utilizando os seguintes antibióticos: amoxicilina, rifampicina, moxifloxacina, vancomicina, tetraciclina, ciprofloxacina, cloranfenicol, benzilpenicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, doxiciclina, eritromicina e azitromicina. **Resultados:** Todas as cepas clínicas testadas foram suscetíveis a amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, benzilpenicilina, doxiciclina, moxifloxacina, tetraciclina e vancomicina. Todos os isolados das espécies *A. viscosus* e *S. aureus* foram suscetíveis aos 12 antibióticos testados. As cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* mostraram padrão de suscetibilidade intermediário contra eritromicina. Algumas cepas de *E. faecalis* e *E. faecium* foram resistentes a azitromicina e rifampicina. **Conclusão:** As cepas clínicas isoladas dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico mostraram perfis diferentes de suscetibilidade antimicrobiana, e nenhum isolado de *E. faecalis* e *E. faecium* apresentou-se suscetível a azitromicina e a eritromicina.

Palavras-chave: Endodontia, infecção endodôntica secundária, E-test, resistência microbiana.

ABSTRACT

Many clinically important bacteria are capable of acquiring and expressing resistance against antimicrobial agents usually used to treat infections, which makes necessary, in some cases, laboratory tests in order to detect the resistance or antimicrobial susceptibility of these microorganisms. **Objective:** evaluate the antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* and *Staphylococcus aureus* strains isolated from radicular canals of teeth with failed endodontic. **Methods:** *Enterococcus faecalis* (n=3), *Enterococcus faecium* (n=3), *Actinomyces viscosus* (n=3) and *Staphylococcus aureus* (n=3) clinical strains collected in vivo from radicular canals with failed endodontic will have their antimicrobial susceptibility tested by the *E-test* method in duplicate using the following antibiotics: amoxicillin, rifampicin, moxifloxacin, vancomycin, tetracycline, ciprofloxacin, cloranfenicol, benzilpenicillin, amoxicillin + clavulanic acid, doxycycline, erythromycin and azithromycin. **Results:** all the clinical strains tested were susceptible to amoxicillin, amoxicillin + clavulanic acid, benzilpenicillin, doxycycline, moxifloxacin, tetracycline and vancomycin. All the isolated *A. viscosus* and *S. aureus* strains were susceptible to the 12 tested antibiotics. *E. faecalis* and *E. faecium* strains showed intermediary susceptibility pattern against erythromycin. Some *E. faecalis* and *E. faecium* strains were resistant against azithromycin and rifampicin. **Conclusion:** clinical strains isolated from radicular canals of teeth with failed endodontic showed different antimicrobial susceptibility profiles, and none of *E. faecalis* or *E. faecium* strains appeared to be susceptible to azithromycin or erythromycin.

Key-words: Endodontics, endodontic infection secondary, E-test, microbial resistance.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. . Infecções persistentes e/ou secundárias: insucesso do tratamento endodôntico associado a recontaminação bacteriana.....	4
2.2. Microbiota de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.....	6
2.3. Resistência dos microrganismos patógenos.....	8
2.4. Principais antibióticos utilizados na terapêutica endodôntica.....	10
3. PROPOSIÇÃO.....	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	
4.1. Microrganismos isolados dos canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico.....	13
4.2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana (<i>E-test</i>) dos isolados clínicos de <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical.....	14
5. RESULTADOS.....	16
6. DISCUSSÃO.....	20
7. CONCLUSÃO.....	24
8. REFERÊNCIAS.....	25

1. INTRODUÇÃO

A terapia endodôntica tem por objetivo a total remoção ou diminuição significativa da presença de microrganismos patógenos através do preparo químico-mecânico. Entretanto, bactérias e seus produtos, que são considerados os principais agentes etiológicos de patologias pulpares e periapicais (Kakehashi *et al.*, 1965; Gomes *et al.*, 1996) provocam a persistência da infecção e/ou infecções secundárias, devido a falha do tratamento endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Schirmeister *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2013) e a recontaminação bacteriana causada pela microinfiltração coronária (Ray & Trope, 1995; Schirmeister *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2012).

As principais causas do insucesso do tratamento endodôntico são as infecções intrarradiculares e esta é caracterizada pela persistência ou surgimento da periodontite apical após a obturação do canal radicular (Endo *et al.*, 2013). A microbiota de um dente com insucesso endodôntico e lesão periapical mostra-se diferente daquela encontrada em dentes com necrose pulpar (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Hancock *et al.*, 2001; Schirmeister *et al.*, 2009), predominando bactérias anaeróbias facultativas Gram-positivas (Peciulienė *et al.*, 2000; Hancock *et al.*, 2001; Cheung & Ho, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003 a;b; Endo *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012).

A particularidade da microbiota encontrada nos canais de dentes com insucesso endodôntico deve-se a um processo de seleção dependente da resistência específica de determinados microrganismos ao preparo químico-mecânico (PQM) e à medicação intracanal; e devido à capacidade de sobreviver em condições ecológicas modificadas no interior do sistema de canais radiculares em um meio nutricional restrito, no qual as relações entre bactérias são mínimas (Sundqvist *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 2012).

Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* são bactérias anaeróbias facultativas, Gram positivas, frequentemente encontradas em canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico

(Chen et al., 2012; Endo et al., 2013). Tais bactérias e seus subprodutos estão diretamente implicados nos casos de insucessos em Endodontia, seja em complicações durante as intervenções, no pós-operatório imediato (processos inflamatórios agudos - flares-ups) ou mediato (com lesões persistentes e refratárias) (Siqueira, 2001; Ricucci & Siqueira, 2008).

Além da falha do tratamento endodôntico (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998) e da recontaminação bacteriana causada pela microinfiltração coronária (Ray & Trope, 1995), o insucesso dos tratamentos endodônticos têm sido associados à resistência dos microrganismos patógenos à medicação utilizada para combatê-los. Esse 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). Estudos têm revelado um aumento surpreendente da resistência antimicrobiana das bactérias que são comumente encontradas nos canais radiculares de dentes com infecção endodôntica. Tais bactérias possuem mecanismos que conferem resistência a uma variedade de antibióticos comumente utilizados na terapêutica (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Shepard & Gilmore, 2002; Owens, 2008; Hawkey, 2008; Poeschl et al., 2010; Skucaite et al., 2010; Endo et al., 2012), principalmente cepas de *Enterococcus* spp.

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). *Enterococcus* spp. 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; Owens, 2008; Hawkey, 2008). Embora a emergência de cepas resistentes seja mais pronunciada em infecções hospitalares ou sistêmicas (Poeschl et al., 2010), estudos de *Enterococcus* spp. isoladas de infecções endodônticas têm demonstrado o aparecimento de resistência bacteriana, principalmente ao regime terapêutico convencional utilizado em procedimentos odontológicos (Skucaite et al., 2010)

Fator de virulência significa qualquer componente do microrganismo que seja exigido para causar ou potencializar dano ao hospedeiro (Schaechter, 1999). Linhagens mais virulentas podem ser resultantes da aquisição de genes pela troca genética, ilhas de patogenicidade em várias espécies codificando toxinas, fatores de adesão e outros fatores associados à virulência (Mundy *et al.*, 2000). Características que determinam virulência são, entre outros: a aderência ao tecido do hospedeiro, invasão e formação de abscesso, modulação da resposta inflamatória e secreção de produtos tóxicos (Eaton & Gasson, 2001). Entre os fatores de virulência mais conhecidos em *Enterococcus* spp. está a resistência intrínseca a antibióticos comumente usados no tratamento da doença e, ainda, outros fatores de virulência também podem ser adquiridos por trocas genéticas, como por exemplo: substância de agregação (*asa*), gelatinase (*gelE*), proteína de superfície de enterococos (*esp*), citolisina e adesinas, que facilitam sua resistência a antibióticos, agressão e adesão aos tecidos.

Desta maneira o objetivo deste trabalho foi avaliar a suscetibilidade de cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico aos agentes antimicrobianos mais utilizados na terapêutica endodôntica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Infecções persistentes e/ou secundárias: insucesso do tratamento endodôntico associado a recontaminação bacteriana

A eliminação ou máxima redução de microrganismos no interior do sistema de canais radiculares é o principal objetivo do tratamento endodôntico, visando a não recontaminação dos mesmos. Em 1965, foi estabelecida a relação causa-efeito de bactérias com as patologias pulpares e perirradiculares com o estudo de Kakehashi, Stanley e Fitzgerald (1965), no qual foram expostas polpas de ratos convencionais e *germ-free* em meios bucais e suas respostas foram posteriormente analisadas histologicamente. Nos animais convencionais, foi observada necrose pulpar e destruição óssea perirradicular, já nos animais *germ-free* as polpas foram reparadas por deposição de dentina terciária.

Sundqvist (1976), posteriormente à evolução das técnicas de identificação dos microrganismos, observou que as infecções presentes nos canais radiculares eram compostas por diversas espécies de bactérias, com predominância de anaeróbias estritas Gram-negativas, que pode ser explicado pela baixa tensão de oxigênio no interior dos canais radiculares.

A periodontite apical de origem endodôntica é um processo inflamatório dinâmico localizado na região perirradicular, o qual pode ser iniciado e mantido por um processo infeccioso (Kakehashi *et al.*, 1965). Na existência prévia da periodontite apical foram observados maiores porcentagens na permanência da infecção após o tratamento endodôntico (Sjögren *et al.*, 1990; Hoskinson *et al.*, 2002; Chugal *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2004; Marquis *et al.*, 2006; Endo *et al.*, 2013).

O principal fator de insucesso endodôntico é a infecção intraradicular (Nair *et al.*, 1990a; Siqueira, 2001; Schirrmeister *et al.*, 2009; Endo *et al.*, 2012; Endo *et al.*, 2013). Espécies bacterianas podem aderir às paredes do canal radicular, aglomerar e formar comunidades organizadas em biofilme, capazes de resistir aos procedimentos antimicrobianos (Nair *et al.*, 1999; Distel *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2012), levando à falha do tratamento. As áreas não atingidas durante o preparo químico-mecânico (PQM) são favoráveis à manutenção da organização desse biofilme, contribuindo para o insucesso da terapia endodôntica (Lin *et al.*, 1991; 1992). Além desses fatores, a

falta de controle asséptico durante os procedimentos clínicos, acesso incorreto à cavidade pulpar, canais não detectados, obturações e restaurações coronárias inadequadas ou ausentes também são fatores que comumente levam à recontaminação dos canais radiculares (Cheung, 1996).

O impedimento de que microrganismos e/ou endotoxinas atinjam os tecidos apicais e periapicais é o objetivo do selamento endodôntico adequado, visto que quando esse selamento não é estabelecido, se constitui um dos principais fatores para o insucesso do tratamento endodôntico (Hauman & Love, 2003; Endo et al., 2012), portanto, um selamento não adequado tanto dos canais radiculares, como da coroa do dente tratado aumenta significativamente as chances de que se ocorra a falha. A contaminação de dentes tratados endodonticamente também ocorre, através da infiltração coronária dos mesmos, via restaurações temporárias ou definitivas deficientes (Siqueira *et al.*, 1999; Adib *et al.*, 2004), se fazendo necessário o retratamento desses canais.

Frente a insucessos do tratamento endodôntico, é preconizado como tratamento eletivo o retratamento dos canais, sendo este preferível à cirurgia periapical ou exodontia (Bergenholtz *et al.*, 1979; Lovdahl, 1992; Çaliskan & Sen, 1996; Weiger *et al.*, 2000; Endo et al., 2012; Endo et al., 2013).

2.2. Microbiota de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical

As infecções endodônticas, de uma forma geral, apresentam um caráter polimicrobiano (Gomes et al., 2004), com predomínio de bactérias anaeróbias estritas (Sundqvist, 1976). Sundqvist & Figdor (2003), observaram que o predomínio anaeróbios estritos se dá pelo consumo de oxigênio e produção de dióxido de carbono e hidrogênio, juntamente com o desenvolvimento do potencial óxido-redução pelos colonizadores iniciais, que favorece o crescimento e domínio deste tipo de microrganismo.

Estudos mostraram que a microbiota de um dente tratado endodonticamente difere da microbiota de um dente com a polpa necrosada e não tratada (Molander et al., 1998; Sundqvist et al., 1998; Hancock et al., 2001; Gomes et al., 2004; Schirrmeister et al., 2009). Enquanto as infecções endodônticas primárias são polimicrobianas, com predomínio de anaeróbias estritas e proporções equivalentes de Gram-positivas e Gram-negativas (Peciulienė et al., 2001), na microbiota de um dente com insucesso do tratamento endodôntico predomina bactérias Gram-positivas, número limitado de microrganismos e espécies anaeróbias facultativas superiores às anaeróbias estritas, sendo *Enterococcus faecalis* o mais prevalente (Molander et al., 1998; Peuciliene et al., 2000; Hancock et al., 2001; Cheung & Ho, 2001; Pinheiro et al., 2003b; Gomes et al., 2004; Chen et al., 2012; Endo et al., 2013; Gomes et al., 2013).

Com o advento de técnicas moleculares, bactérias anaeróbias estritas, tais como *Dialister*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Gemella*, *Mogibacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Selenomonas*, *Synergistes*, *Solobacterium*, e *Treponema* também foram detectadas nos canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico. Porém estes métodos confirmam a maior frequência de *Enterococcus faecalis* nestes dentes, podendo estar presente em até 90% dos casos estudados (Pinheiro, 2005; Delboni, 2009; Gomes et al., 2013).

Algumas bactérias Gram-positivas têm sido associadas a infecções de dentes indicados para tratamento endodôntico, destacando-se *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces* spp., *Staphylococcus* spp., *Lactobacillus* spp. e *Streptococcus* spp. (Gomes et al., 1996b; Chávez de Paz, 2003; Schirrmeister et al., 2009; Chen et al., 2012).

Segundo Gomes et al. (2013), dentes com insucesso da terapia endodôntica apresentam 9 vezes maior chance da presença de *Enterococcus faecalis* quando comparada aos casos de infecção primária. Isto sugere que esta espécie pode ser inibida por outros membros presentes no consórcio bacteriano misto comumente encontrado nas infecções primárias ou que eles estejam presentes em menor número de células, não sendo detectadas pelo método da cultura. O fato deste microrganismo ser encontrado com tanta frequência nestes canais fez com que inúmeros autores nomeassem-no como o principal patógeno envolvido no insucesso da terapia endodôntica. Vários estudos que empregam métodos moleculares de diagnóstico têm apontado a presença de diferentes microrganismos em casos de infecções intrarradiculares associadas ao insucesso do tratamento endodôntico. Entretanto, a maioria dos autores concorda que o número da carga bacteriana e sua diversidade são maiores no grupo da infecção primária.

2.3. Resistência dos microrganismos aos antibióticos

O uso indiscriminado de antibióticos tem proporcionado a seleção positiva de bactérias que desenvolveram mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Tomaz, 1994; Skucaite et al., 2010). Alterações fisiológicas ou estruturais da célula bacteriana desenvolvem o mecanismo de resistência, que atua como uma estratégia de sobrevivência bacteriana, frente à grande utilização de antibióticos (Forbes *et al.*, 1998; Skucaite et al., 2010).

No geral, não é utilizada a administração de antibióticos em infecções crônicas de origem endodôntica, a não ser que o processo infeccioso ocorra durante uma exacerbação aguda com sinais e sintomas de disseminação do processo infeccioso (Abbott *et al.*, 1990; Poeschl et al., 2010; Skucaite et al., 2010). Os autores observaram que lesões periapicais crônicas estão associadas a dentes com polpas necrosadas ou com tratamento endodôntico prévio, que não possuem suprimento sanguíneo. Portanto, como o antibiótico é administrado por via sistêmica, apenas uma parte insignificante da concentração do antibiótico atingirá o canal radicular, sendo ineficiente para inibir a proliferação bacteriana. Em contrapartida, os antibióticos sistêmicos são utilizados como complemento à terapêutica endodôntica, sendo utilizados em regimes profiláticos ao desenvolvimento de endocardites bacterianas (Abbott, *et al.*, 1990).

Segundo Shepard & Gilmore (2002), *Enterococcus* spp. obtiveram um surpreendente aumento de resistência antimicrobiana, especialmente os isolados de infecções hospitalares. Desenvolveram mecanismos de resistência a uma grande variedade de antibióticos utilizados na terapêutica medicamentosa (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Shepard & Gilmore, 2002).

Shepard & Gilmore (2002) realizaram um estudo em que mostraram que as concentrações inibitórias mínimas (CIMs) da penicilina, frente a *E. faecalis* são 10 a 100 vezes maiores do que aquelas encontradas para a maioria dos *Streptococcus* spp. Apesar de eles serem discretamente mais sensíveis à amoxicilina e à ampicilina, esses antibióticos apresentam apenas efeito bacteriostático e nenhum efeito bactericida sobre a maioria das *Enterococcus* spp. (Shepard & Gilmore, 2002).

Estudos têm mostrado que a mutação do DNA resistente ou a aquisição de um novo DNA levam ao desenvolvimento da resistência aos agentes antimicrobianos Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997). Eritromicina, tetraciclina, cloranfenicol, e, mais recentemente, vancomicina estão entre as várias classes de antibióticos das quais os enterococos conferiram resistência ao adquirir determinantes genéticos. (Murray, 1990; Morrison *et al.*, 1997; Mundy *et al.*, 2000; Shepard & Gilmore, 2002).

2.4. Principais antibióticos utilizados na terapêutica endodôntica

Espécies isoladas de infecções endodônticas apresentam diferentes perfis de susceptibilidade aos agentes antimicrobianos (Gomes et al., 2011), fazendo-se necessária a realização de estudos que avaliem a resistência das principais bactérias encontradas em canais radiculares infeccionados frente aos principais antibióticos utilizados para combatê-las.

Kuriyama *et al.* (2001) observaram a incidência da produção de beta-lactamase em bactérias anaeróbias gram-negativas isoladas de 93 amostras de infecções odontogênicas orofaciais e a susceptibilidade antimicrobiana dos isolados contra 11 antibióticos diferentes. Um total de 191 bactérias anaeróbicas gram-negativas foi isolado a partir das amostras. Dessas, a Beta-lactamase foi detectada em 35,6% do *Prevotella* pigmentados de negro e de 31,9% de *Prevotella* não pigmentada. Ampicilina, cefazolina e cefotaxima apresentaram atividade reduzida frente as cepas de *Prevotella* beta-lactamase-positivos, enquanto que ampicilina/sulbactama, cefmetazol e imipenem continuaram a ser eficazes contra estas cepas. Todos os antibióticos beta-lactâmicos testados foram eficazes contra *Porphyromonas* e *Fusobacterium*.

Pinheiro *et al.* (2003) comprovaram que *Enterococcus faecalis* foram susceptíveis à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico e apresentaram resistência à eritromicina e azitromicina. Como os enterococos apresentam resistência intrínseca à clindamicina, os autores puderam concluir que os principais antibióticos utilizados como alternativa para pacientes alérgicos à penicilina e seus derivados, durante o tratamento odontológico, apresentam limitado valor contra essas espécies, devendo-se considerar drogas alternativas para a terapêutica profilática contra a endocardite bacteriana durante retratamentos endodônticos.

Jacinto *et al.* (2008) analisaram 110 amostras de dentes com infecção primária periapical por métodos de cultura, e isolou 580 estirpes individuais, das quais 81,4% eram anaeróbios estritos. *Fusobacterium nucleatum* foi encontrado em 38 canais radiculares e foi associado com *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp. e *Eubacterium* spp. *Fusobacterium necrophorum* foi encontrado em 20 canais radiculares e foi associado com *Peptostreptococcus prevotii*. Foi realizado o teste de susceptibilidade

bacteriana com *F. nucleatum* e *F. necrophorum* utilizando o *E-test*, onde 100% das amostras se apresentaram susceptíveis à amoxicilina, amoxicilina+clavulanato e cefaclor, o que explica o uso da amoxicilina como antibiótico de primeira escolha frente a infecções de origem endodôntica.

Skukaite *et al.* (2010) testaram penicilina G, ampicilina, amoxicilina, amoxicilina+ clavulanato, clindamicina, metronidazol, eritromicina, tetraciclina, e vancomicina, através do método *E-test*, com bactérias isoladas de 49 amostras de dentes com insucesso endodôntico. Das amostras estudadas, os patógenos predominantes apresentaram alta sensibilidade à penicilina e à amoxicilina, sendo esses, portanto, escolhas eficazes na terapêutica endodôntica quando apenas o tratamento de canal convencional não é suficiente por si só. Os autores também observaram que a clindamicina deve ser administrada a pacientes que apresentam alergia à penicilina e seus derivados.

Lins *et al.* (2013) estudaram 20 isolados de *Enterococcus faecalis* de 43 pacientes com infecções endodônticas primárias. A susceptibilidade a antimicrobianos foi determinada por disco-difusão em ágar, utilizando o protocolo recomendado do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Todos os isolados foram considerados sensíveis à penicilina G, eritromicina e vancomicina. Os autores observaram ainda que *E. faecalis* apresentou elevado nível de resistência à tetraciclina, antibiótico comumente administrado para combater à infecções orais.

3. PROPOSIÇÃO

Uma das vertentes da linha de pesquisa da área de Endodontia da FOP-UNICAMP intitulada “Microbiologia aplicada à Endodontia” é a investigação dos microrganismos envolvidos no insucesso do tratamento endodôntico. Trabalhos anteriores mostram que cepas clínicas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* isoladas de infecções endodônticas apresentam resistência bacteriana a antibióticos preconizados durante a terapia convencional de procedimentos odontológicos. Dessa forma, devido ao uso indiscriminado de antibióticos, atualmente faz-se necessário verificar a suscetibilidade dessas cepas frente a utilização dos antimicrobianos utilizados em infecções odontogênicas.

Através da investigação de microrganismos e sua resposta perante determinados antibióticos, será avaliado *in vitro* a suscetibilidade antimicrobiana aos antibióticos mais utilizados na terapêutica endodôntica frente as cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico, através do método do *E-test*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/UNICAMP), protocolo n° 020/2011, que satisfizeram as condições de inclusão.

4.1. Microrganismos isolados dos canais radiculares de dentes com insucesso do tratamento endodôntico.

As cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* (n=3), *Enterococcus faecium* (n=3), *Actinomyces viscosus* (n=3) e *Staphylococcus aureus* (n=3) foram coletadas in vivo de 15 canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico. Colônias isoladas foram mantidas em -20 °C para posterior processamento.

Para o estudo, As colônias bacterianas congeladas foram plaqueadas em uma placa contendo BHI + 5% de sangue desfibrinado de carneiro e incubadas em cabine de CO₂ (Jouan, IG 150, Saint-Herblain, França). A morfologia bacteriana após incubação foi verificada através da coloração de Gram, e testadas quanto à produção de catalase.

Após análise fenotípica as bactérias Gram-positivas anaeróbias facultativas foram selecionadas para realização do teste bioquímico no intuito de identificar cepas clínicas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus*.

Foi utilizado o teste bioquímico API 20 Strep e o API 20 Staph (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França) para especificação de microrganismos isolados, cocos Gram-positivos e catalase-negativa (BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, França). Esse teste possui reagentes que evidenciam pela mudança de cor, em determinados períodos, as exigências nutricionais e compostos específicos produzidos pelas bactérias. Os Kits forneceram gabaritos para finalizar a identificação, que pode ser verificada através do site: <https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>.

4.2. Teste de suscetibilidade antimicrobiana (*E-test*) dos isolados clínicos de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical

O sistema do *E-test* consiste em uma fita plástica de 50 mm 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 concentração inibitória mínima (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).

Cepas clínicas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* isoladas de canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico e lesão periapical tiveram sua suscetibilidade antimicrobiana testada através do método *E-test* (AB Biodisk, Solna, Suécia). Os agentes antimicrobianos testados foram: benzilpenicilina (PG), amoxicilina (AC), amoxicilina + ácido clavulânico (XL), eritromicina (EM), azitromicina (AZ), vancomicina (VA), cloranfenicol (CL), tetraciclina (TC), doxiciclina (DC), moxifloxacina (MX), ciprofloxacina (CI) e rifampicina (RI).

Para preparar o inóculo, após 24 h de incubação da espécie bacteriana em placas de ágar sangue, as colônias bacterianas foram transferidas para o meio líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) e agitadas, 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) com comprimento de onda de 800 nm. Placas contendo 4 mm de espessura de *Luria Bertani Agar* (LB, Índia) foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, uniformemente, através de swab estéril, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de *E-test*, que foram previamente removidas do congelador, e 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 contendo as bactérias anaeróbias facultativas foram imediatamente incubadas em uma estufa de CO₂, a 37°C, e a leitura realizada após 24 e 48 h de incubação. Os valores das CIM 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. O valor de CIM₅₀ e CIM₉₀ correspondem às concentrações inibitórias mínimas para 50% e 90% dos isolados, respectivamente. De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do *E-test* em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada seguindo o guia de interpretação da CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores interpretativos de pontos de corte equivalentes das concentrações inibitórias mínimas - CIM (μ /ml) dos antimicrobianos avaliados nos testes de *Enterococcus* spp. (NCCLS- M100 S15) e Gram-positivos.

Agentes antimicrobianos	Suscetível	Resistente
Benzilpenicilina (PG)	≤ 8	≥ 16
Amoxicilina (AC)	≤ 8	≥ 16
Amoxicilina + ácido clavulânico (XL)	≤ 8	≥ 16
Eritromicina (EM)	$\leq 0,5$	≥ 8
Azitromicina (AZ)	≤ 2	≥ 8
Vancomicina (VA)	≤ 4	≥ 32
Cloranfenicol (CL)	≤ 8	≥ 32
Tetraciclina (TC)	≤ 4	≥ 16
Doxiciclina (DC)	≤ 4	≥ 16
Moxifloxacin (MX)	≤ 2	≥ 8
Ciprofloxacin (CI)	≤ 1	≥ 4
Rifampicina (RI)	≤ 1	≥ 4

5. RESULTADOS

Tabelas 2 a 5 mostram os valores encontrados na leitura do E-test para os isolados clínicos testados, cujos testes foram realizados em duplicadas para cada microrganismo.

Tabela 2: Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos antibióticos e classificação em suscetível (S), intermediário (I) e resistente ® baseada nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S15) dos *Enterococcus faecalis* (n=3) isoladas de canais radiculares.

	Isolado 1		Isolado 2		Isolado 3		CIM
AC	S	0,142	S	0,31	S	0,44	0,31 - 0,44
RI	S	1	R	7	S	1	1 - 7
MX	S	0,44	S	0,31	S	1,25	0,44 - 1,25
VA	S	0,44	S	2	S	2,5	2 - 2,5
TC	S	0,19	S	0,75	S	0,44	0,44 - 0,75
CI	I	1,5	S	1	S	0,87	1 - 1,5
CL	S	8	I	10	S	6	8 - 10
PG	S	1,5	S	1	S	1	1-1,5
XL	S	0,38	S	0,44	S	0,5	0,44 - 0,5
DC	S	0,15	S	0,38	S	0,25	0,25 - 0,38
EM	I	1	I	1	I	1,75	1 - 1,75
AZ	R	14	I	3,5	I	3	3,5 - 14

S = Suscetível, I = Intermediário, R = Resistente, RI = Rifampicina, XL = Amoxicilina, PG = Benzilpenicilina, AZ = Azitromicina, MX = Moxifloxacina, DC = Doxicilina, AC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico, CL = Cloranfenicol, CI = Ciproflaxacina, EM = Eritromicina, VA = Vancomicina, TC = Tetraciclina.

Tabela 3: Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos antibióticos e classificação em suscetível (S), intermediário (I) e resistente ® baseada nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S15) dos *Enterococcus faecium* (n=3) isoladas de canais radiculares.

	Isolado 1		Isolado 2		Isolado 3		CIM
AC	S	0,5	S	0,75	S	0,5	0,5 - 0,75
RI	R	4	I	3	R	4	3 – 4
MX	S	0,38	S	0,38	S	0,5	0,38 - 0,5
VA	S	3	S	4	S	4	3 – 4
TC	S	0,75	S	0,75	S	1	0,75 - 1
CI	I	1,5	S	1	S	1	1 - 1,5
CL	S	8	I	12	I	14	12 - 14
PG	S	0,5	S	0,75	S	0,75	0,5 - 0,75
XL	S	0,75	S	0,75	S	0,75	0,75 - 0,75
DC	S	0,25	S	0,38	S	0,25	0,25 - 0,38
EM	I	2	I	3	I	3	2 – 3
AZ	I	4	I	6	R	10	6 - 10

S = Suscetível, I = Intermediário, R = Resistente, RI = Rifampicina, XL = Amoxicilina, PG = Benzilpenicilina, AZ = Azitromicina, MX = Moxifloxacina, DC = Doxicilina, AC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico, CL = Clo-ranfenicol, CI = Ciproflaxacina, EM = Eritromicina, VA = Vancomicina, TC = Tetraciclina.

Tabela 4: Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos antibióticos e classificação em suscetível (S), intermediário (I) e resistente ® baseada nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S15) dos *Actinomyces viscosus* (n=3) isoladas de canais radiculares.

	Isolado 1		Isolado 2		Isolado 3		CIM
AC	S	0,19	S	0,19	S	0,19	0,19 - 0,19
RI	S	0,012	S	0,012	S	0,002	0,012 - 0,02
MX	S	0,064	S	0,047	S	0,25	0,047 - 0,25
VA	S	2	S	2	S	0,5	2 – 2
TC	S	2	S	3	S	2	2 – 3
CI	S	0,125	S	0,125	S	1	0,125 - 1
CL	S	6	S	6	S	8	6 – 8
PG	S	0,125	S	0,19	S	0,016	0,0125 - 0,19
XL	S	0,19	S	0,25	S	0,064	0,19 - 0,25
DC	S	0,125	S	0,19	S	0,19	0,19 - 0,19
EM	I	2	I	2	S	0,016	2 – 2
AZ	I	4	I	4	I	4	4 – 4

S = Suscetível, I = Intermediário, R = Resistente, RI = Rifampicina, XL = Amoxicilina, PG = Benzilpenicilina, AZ = Azitromicina, MX = Moxifloxacina, DC = Doxicilina, AC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico, CL = Cloranfenicol, CI = Ciproflaxacina, EM = Eritromicina, VA = Vancomicina, TC = Tetraciclina.

Tabela 5: Valores das CIMs ($\mu\text{g/mL}$) dos antibióticos e classificação em suscetível (S), intermediário (I) e resistente ® baseada nos valores interpretativos da NCCLS (M100 S15) dos *Staphylococcus aureus* (n=3) isoladas de canais radiculares.

	Isolado 1		Isolado 2		Isolado 3		CIM
AC	S	0,125	S	0,125	S	0,125	0,125 - 0,125
RI	S	0,008	S	0,008	S	0,008	0,008 - 0,008
MX	S	0,032	S	0,032	S	0,032	0,032 - 0,032
VA	S	0,5	S	0,5	S	0,5	0,5 - 0,5
TC	S	0,5	S	0,5	S	0,5	0,5 - 0,5
CI	S	0,125	S	0,125	S	0,125	0,125 - 0,125
CL	S	3	S	3	S	3	3 - 3
PG	S	0,064	S	0,064	S	0,064	0,064 - 0,064
XL	S	0,19	S	0,19	S	0,19	0,19 - 0,19
DC	S	0,38	S	0,19	S	0,19	0,19 - 0,38
EM	S	0,094	S	0,125	S	0,25	0,125 - 0,25
AZ	S	0,25	S	0,19	S	2	0,25 - 2

S = Suscetível, I = Intermediário, R = Resistente, RI = Rifampicina, XL = Amoxicilina, PG = Benzilpenicilina, AZ = Azitromicina, MX = Moxifloxacina, DC = Doxicilina, AC = Amoxicilina + Ácido Clavulânico, CL = Cloranfenicol, CI = Ciproflaxacina, EM = Eritromicina, VA = Vancomicina, TC = Tetraciclina.

6. DISCUSSÃO

Anaeróbios facultativos Gram-positivos têm um papel importante nas infecções endodônticas secundárias e/ou recorrentes (Schirrmeister et al., 2009; Chen et al., 2012; Endo et al., 2012; Endo et al., 2013). Diante dessa informação, cepas de *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus* isoladas de dentes com insucesso endodôntico tiveram sua suscetibilidade antimicrobiana a antibióticos comumente usados em endodontia avaliada neste estudo.

O *E-test* é um método fácil de se utilizar e interpretar, além de ser confiável para se testar a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias envolvidas em infecções endodônticas (Citron et al., 1991; Jacinto et al., 2008; Skucaite et al., 2010). Nesse estudo, este método foi empregado para testar os seguintes antibióticos: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, eritromicina, azitromicina, vancomicina, cloranfenicol, tetraciclina, doxiciclina, moxifloxacina, ciprofloxacina e rifampicina.

De acordo com os resultados obtidos, levando-se em consideração os valores de concentração inibitória mínima (CIM) determinadas pela NCCLS, todas as cepas de *E. faecalis*, *E. faecium*, *A. viscosus* e *S. aureus* mostraram-se 100% susceptíveis à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico, corroborando com os achados de Pinheiro et al. (2003), que citam estas drogas como as mais comumente utilizadas na prática endodôntica. Esse resultado confirma a utilização da penicilina e seus derivados como antibióticos de primeira escolha no tratamento de infecções de origem endodôntica e como utilização na terapêutica profilática contra a endocardite bacteriana (Jacinto et al., 2008; Skucaite et al., 2010).

Nos casos de pacientes que apresentam hipersensibilidade à penicilina e seus derivados, faz-se necessária a utilização de outros grupos de antibióticos, sendo a eritromicina e azitromicina as substâncias mais prescritas pelos endodontistas. Entretanto, no presente estudo observou-se que *E. faecalis* e *E. faecium* apresentaram resistência a esses dois antibióticos, concordando os achados de Fass (1993) que citaram a azitromicina com menor eficácia contra *Enterococcus* spp. Em desacordo, Lins et al. (2013), mostraram que cepas de *E. faecalis* foram sensíveis à eritromicina. Os resultados apontam uma discordância na literatura que pode ser explicada pela resistência a determinados antibióticos derivada de mutações no DNA bacteriano. (Murray,

1990; Morrison et al., 1997; Mundy et al., 2000; Shepard & Gilmore, 2002; Owens, 2008; Hawkey, 2008).

Já as cepas de *A. viscosus* (33,3%) e *S. aureus* (66,6%) mostraram-se suscetíveis à eritromicina, enquanto que somente *S. aureus* (100%) mostrou-se suscetível à azitromicina. Portanto, a azitromicina, comparada à eritromicina apresentou menor eficácia frente aos microrganismos estudados. Tais resultados evidenciam que ambas as substâncias não são boas escolhas nos casos de infecção endodôntica secundária e/ou recorrente, necessitando de mais estudos que investiguem seu poder bactericida frente aos principais microrganismos encontradas em casos de insucessos do tratamento endodôntico. (Skukaite et al., 2010; Poeschl et al., 2010)

Lins *et al.* (2013) observaram em seu estudo que cepas de *E. faecalis* isoladas de casos de infecção endodôntica primária foram resistentes à tetraciclina. Já os resultados do presente trabalho discordam deste dado e apontam que, todos os microrganismos testados apresentaram suscetibilidade à tetraciclina, assim como à vancomicina, doxiciclina e moxifloxacina. Como se trata de cepas bacterianas coletadas de biofilmes distintos, - já que nos casos de infecção primária há uma diversidade e um número maior de microrganismos envolvidos e uma interação entre eles, não é possível uma comparação direta entre os estudos, apesar de terem sido realizados com a mesma espécie bacteriana. Apesar de resistência bacteriana a qualquer membro do grupo das tetraciclinas geralmente resultar em resistência cruzada a outras drogas do grupo (Chambers, 2001), nossos achados demonstram que todas estas drogas possuem um efeito antimicrobiano satisfatório, já que atuaram de maneira efetiva sobre bactérias envolvidas em casos de insucesso do tratamento endodôntico que normalmente possuem mecanismos mais desenvolvidos de resistência antimicrobiana.

Doxiciclina e moxifloxacina obtiveram excelentes resultados no presente estudo com todas as cepas estudadas, e parecem ser uma alternativa razoável para pacientes alérgicos à penicilina ou com resistência a antibióticos prescritos comumente. Entretanto, não existe um número suficiente de trabalhos que permitam avaliar a relação risco/benefício dessas drogas no tratamento ou profilaxia das infecções odontológicas.

Todas as cepas analisadas no presente estudo se mostraram susceptíveis à vancomicina, e estudos prévios da suscetibilidade de enterococos orais também demonstraram a alta suscetibilidade desses microrganismos a esse fármaco (Rams *et al.*, 1992; Dahlén *et al.*, 2000). Entretanto, a literatura sugere que vancomicina deva ser empregada somente no tratamento de infecções graves, já que possui amplo espectro de ação, o que não condiz com a prática endodôntica em geral. (Andrade, 1999; Chambers, 2001).

Nesse estudo, o clorafenicol apresentou 100% de eficácia frente *S. aureus* e *A. viscosus* e susceptibilidade intermediária frente *E. faecalis* e *E. faecium*. Esses resultados estão de acordo com Sedgley *et al.* (2004), que encontraram 91% dos enterococos orais sensíveis ao cloranfenicol, o que comprova a susceptibilidade intermediária desse antibiótico. Juntamente com o grupo das tetraciclinas, o clorafenicol torna-se uma alternativa aos casos de alergia à penicilina ou em situações onde os antibióticos de rotina não obtiveram os resultados esperados. A Ciprofloxacina também se mostrou com susceptibilidade intermediária nesse estudo, condizendo com o estudo de Rams *et al.* (2013), que encontrou apenas 10,6% de resistência intermediária nos isolados observados de *E. faecalis*.

A rifampicina foi o antibiótico que apresentou pior eficácia nesse estudo, com 66,6% das cepas de *E. faecalis* resistentes e 33,3% das de *E. faecium*. Já no estudo de Sedgley (2005), todas as cepas estudadas de *E. faecalis* se mostraram sensíveis, o que pode sugerir um desenvolvimento de resistência dessas bactérias com o passar dos anos. Essa sugestão implica na necessidade de estudos periódicos e mais detalhados a fim de verificar os mecanismos desenvolvidos pelos microrganismos que resultam em sua resistência frente a este fármaco.

De acordo com o estudo realizado, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico foram os antibióticos que alcançaram melhores resultados frente as 4 bactérias estudadas. Visto que os resultados obtidos foram muito próximos, a associação das duas drogas não apresenta vantagem sobre o uso da amoxicilina de forma isolada. Portanto, segundo este estudo, o antibiótico de primeira escolha para profilaxia de endocardite bacteriana e em casos de terapêutica antimicrobiana em retratamentos endodônticos é a amoxicilina. Para o caso de pacientes com alergia à penicilina e seus derivados, os resultados do trabalho realizado suportam a escolha de doxiciclina e

moxifloxacin, pois das drogas não-provenientes da penicilina, foram as que apresentaram a maior eficácia diante de todas as bactérias estudadas. Entretanto uma avaliação do risco/benefício da dose mínima dessas drogas deve ser realizada antes da sua prescrição na clínica odontológica.

Diversos estudos microbiológicos envolvendo dentes com insucesso endodôntico têm sido realizados para se obter uma melhor eficácia no tratamento das infecções relacionadas ao complexo de canais radiculares. Contudo, visto que as bactérias desenvolvem periodicamente resistência às principais drogas utilizadas, deve-se realizar estudos constantes sobre a ação dessas drogas na terapêutica antimicrobiana.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos e das condições experimentais utilizadas nesse trabalho, pode-se concluir que:

- a. A microbiota de dentes com insucesso endodôntico é composta por um número limitado de bactérias, predominantemente Gram-positivas e anaeróbias facultativas.
- b. As cepas de todos os microrganismos testados (*Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Actinomyces viscosus* e *Staphylococcus aureus*) foram altamente suscetíveis à amoxicilina e à associação de amoxicilina + ácido clavulânico, sendo a amoxicilina o antibiótico de primeira escolha.
- c. Todos os isolados foram suscetíveis à doxiciclina, moxifloxacina, vancomicina, e tetraciclina, enquanto a maioria foi suscetível à ciprofloxacina e ao cloranfenicol. Eritromicina e azitromicina apresentaram pouca eficácia frente às cepas.
- d. A rifampicina foi o antibiótico com o maior índice de resistência bacteriana, sendo o antibiótico com menor eficácia sobre isolados dos canais radiculares de dentes com insucesso endodôntico estudados.

8. REFERÊNCIAS*

Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. *Austr Dent J*. 1990, 35: 50-60.

Adib V, Spratt D, NG YL, Gulabilava K. Cultivable microbial flora associated with persistent periapical disease and coronal leakage after root canal treatment: a preliminary study. *Int Endod J*. 2004; 37(8): 542-51.

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

Bergenholtz G, Lekholm U, Milthon R, Heden G, Odesjö B, Engström B. Retreatment of endodontic fillings. *Scand J Dent Res*. 1979; 87(3): 217-24.

Çalışkan MK, Sen BH. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis using calcium hydroxide: a long-term study. *Endod Dent Traumatol*. 1996; 12(5): 215-21.

Chambers HF. Antimicrobial agents: protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 10th edn, New York, USA: McGraw-Hill. 2001; pp. 1239-72.

Chávez de Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*. 2003, 36: 500-8.

Chen Z, Bem-xiang H, Huan-ying Z, Zheng S. Microbial diversity in failed endodontic root-filled teeth. *Chin Med J*. 2012; 125(6): 1163-1168.

Cheung GSP. Endodontic failures – changing the approach. *Int Dent J*. 1996; 46(3): 131-8

Cheung GSP, Ho MWM. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16(6): 332-7.

Chugal NM, Clive JM, Spangberg LS. Endodontic infection: some biologic and treatment factors associated with outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 96(1): 81–90.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Citron DM, Ostavari MI, Karlsson A, Goldstein EJC Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. J Clin Microbio. 1991; 29: 2197-2203.

Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of *enterococci* isolated from the root canal. Oral Microbiology and Immunology. 2000; 15, 309-12.

Delboni MG. Identificação dos microrganismos presentes na saliva, na coroa dental e no canal radicular de dentes indicados ao retratamento endodôntico e análise da suscetibilidade antimicrobiana, dos fatores de virulência e da diversidade genética dos *Enterococcus faecalis* isolados. Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, 2009.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002; 28(10): 689 –93.

Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl Environ Microbiol. 2001; 67:1628-35.

Endo MS, Martinho FC, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2012; 31: 2575-2583.

Endo MS, Ferraz CCR, Zaia AA, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. Eur J Dent. 2013; 7(3): 302-309.

Fass RJ. 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. 1993; 37: 2080-6.

Forbes GM, Collins BJ, McCullough CA, Coombs GW, Robins PD. Short duration therapy for *Helicobacter pylori* in Western Australia: the impact of metronidazole resistance. Aust N Z J Med. 1998; 28:13-7.

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

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International Endodontic Journal*. 1996b, 29: 235-41.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004; 19(2): 71-6.

Gomes BP, Jacinto RC, Montagner F, Sousa EL, Ferraz CC. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod*. 2011; 37(8):1058-62.

Gomes, B.P.F.A.; Montagner, Martinho FC. Aspectos microbiológicos das infecções endodônticas: conceitos e aplicações. In: *Microbiologia / Imunologia Geral e Odontológica*. Moysés ST, Kriger L, Moysés S (eds), São Paulo: Artes Médicas. 2013

Hancock HH, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91(5): 579-86.

Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 2. Root-canal-filling materials. *Int Endod J*. 2003; 36(2): 75-85.

Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:1–9.

Hoskinson SE, Ng YL, Hoskinson AE, Moles DR, Gulabivala K. A retrospective comparison of outcome of root canal treatment using two different protocols. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002; 93(6): 705–15.

Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FG, Almeida GC, Gomes BP. Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* isolated from primary endodontic infection. J Endod. 2008; 34(12): 1451-6.

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

Lin LM, Pascon EA, Skribner J, Gangler P, Langeland K. Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1991; 71(5): 603-11.

Lin LM; Skribner JE; Gaengler P. Factors associated with endodontic treatment failures. J Endod. 1992; 18(12): 625-7.

Lins RX, de Oliveira Andrade A, Hirata Junior R, Wilson MJ, Lewis MA, Williams DW, Fidel RA. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. J Dent. 2013; 41(9): 779-86.

Lovdahl PE. Endodontic retreatment. Dent Clin of North Am 1992; 36(2): 473–90.

Marquis VL, Dao T, Farzaneh M, Abitbol S, Friedman S. Treatment Outcome in Endodontics: The Toronto Study. Phase III: initial Treatment. J Endod. 2006; 32 : (4) 299 –306.

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

Morrison D, Woodford N, Cookson B. *Enterococci* as emerging pathogens of humans. Soc Appl Bacteriol Symp Ser. 1997; 26:89S-99S.

Mundy LM, Sahm DF, Gilmore M. Relationships between *enterococcal* virulence and antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2000; 13:513-22.

Murray BE. The life and times of the *Enterococcus*. Clin Microbiol Rev. 1990; 3:46-65.

Nair PNR; Sjögren U; Figdor D; Sundqvist G. Persistent periapical radiolucencies of root-filled human teeth, failed endodontic treatments, and periapical scars. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999; 87(5): 617-27

Owens RC Jr. An overview of harms associated with b-lactam antimicrobials: where do the carbapenems fit in? Crit Care 2008; 12:1–11.

Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. J Endod. 2000; 26(10): 593-5.

Peters OA, Barbakow F, Peters CI. An analysis of endodontic treatment with three nickeltitanium rotary root canal preparation techniques. Int Endod J. 2004; 37(12): 849 –59.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, 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. 2003a; 18(2): 100 –3.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J 2003b; 36(1): 1–11.

Poeschl PW, Spusta L, Russmueller G, et al. Antibiotic susceptibility and resistance of the odontogenic microbiological spectrum and its clinical impact on severe deep space head and neck infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2010; 110:151–6.

Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. Oral Microbiology and Immunology. 1992; 7: 249-52.

Rams TE, Feik D, Mortensen JE, Degener JE, van Winkelhoff AJ. Antibiotic susceptibility of periodontal *Enterococcus faecalis*. J Periodontol. 2013; 84(7):1026-33.

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(1): 12-8.

Ricucci D, Siqueira JF Jr. Apical *actinomycosis* as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. J Endod. 2008; 34:1124-9.

Schaechter M. A paean to Microbiology and Molecular Biology Reviews. Microbiol Mol Biol Rev. 1999; 63:265.

Schirrmeister JF, Liebenow AL, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, et al. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. J Endod 2009; 35: 169-174.

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

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlén G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20(1):10-9.

Shepard BD, Gilmore MS. Antibiotic-resistant *enterococci*: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. Microbes Infect. 2002; 4:215-24.

Siqueira, JF Jr; Rôças IN; Lopes HP; Uzeda M. Coronal leakage of two root canal sealers containing calcium hydroxide after exposure to human saliva. J Endod. 1999; 25(1): 14-6.

Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. Int Endod J. 2001; 34: 1-10.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. Int Endod J. 2001; 34(4): 280-4.

Sjögren U, Sundqvist G, Nair PNR. Tissue reaction to gutta-percha particles of various sizes when implanted subcutaneously in guinea pigs. Eur J Oral Scie. 1995; 103(5): 313–21.

Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. J Endod. 2010; 36(10): 1611-6.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod. 1998; 85(1): 86-93.

Sundqvist G. Life as an endodontic pathogen Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. Endod Topics. 2003; 6: 3-28.

Tomasz A. Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. New Engl J Med. 1994, 28: 1247-51.

Weiger R, Rosendahl R, Löst C. Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesion. Int Endod J. 2000; 33(3): 219–2.