

**ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO**

**Relação da sintomatologia com a presença de  
microrganismos e endotoxinas em canais  
radiculares com necrose e suscetibilidade  
antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas.**

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

**Piracicaba  
2007**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

J119r

Jacinto, Rogério de Castilho.

Relação da sintomatologia com a presença de microrganismos e endotoxinas em canais radiculares com necrose e suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas. / Rogério de Castilho Jacinto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2007.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.  
Tese (Doutorado) – 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.

(mg/fop)

Título em Inglês: Association of endodontic symptoms with specific microorganisms and endotoxin from infected root canals and antimicrobial susceptibility testing of strict anaerobic bacteria isolated

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Endodontics, Endodontic infections, Antibiotics, E-test, QCL-1000, Lymulus Amebocyte Lysate.

Área de Concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca Examinadora: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Francisco José de Souza Filho, Eduardo Dias de Andrade, Haroun Neamath Shah, Carlos Eduardo Bueno

Data da Defesa: 23-01-2007

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 23 de Janeiro de 2007, considerou o candidato ROGÉRIO DE CASTILHO JACINTO aprovado.

PROFa. DRa. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

PROF. DR. CARLOS EDUARDO DA SILVEIRA BUENO

PROF. DR. HAROUN NEAMATH SHAH

PROF. DR. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

PROF. DR. EDUARDO DIAS DE ANDRADE

**Dedico....**

**A minha mãe Therezinha e a meus irmãos André e Henrique pelo apoio, incentivo e por estarem sempre presentes na minha vida.**

**A todos os meus familiares, em especial a minha avó Eunice e à memória de meu avô Benedito.**

**A minha orientadora Prof<sup>a</sup> Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes que sempre me incentivou e nunca mediu esforços para a realização deste trabalho.**

**Ao Professor Haroun Shah, sua esposa Saheer Gharbia e sua filha Laila Shah pela amizade e carinho durante minha estadia em Londres e por terem me recebido como parte de sua família.**

**A todos que de alguma forma fizeram parte desta caminhada.**

**Agradeço ...**

**A Deus, que me iluminou e inspirou a realizar este trabalho e me confortou nos momentos difíceis.**

**À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, que foi uma grande orientadora e incentivadora, além de um exemplo de dedicação e competência.**

**Ao Prof. Dr Haroun N. Shah, que me recebeu em seu laboratório e se tornou um grande amigo, um exemplo de dedicação à ciência e de generosidade.**

**À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, de quem recebi apoio necessário para realização deste trabalho.**

**À Health Protection Agency – Centre for infections - Londres, instituição onde realizei o estágio de doutoramento e a todos os membros da Molecular Identification Service Unit, pela constante ajuda e companherismo.**

**Aos órgãos de fomento: FAPESP e CAPES pelo apoio financeiro durante meu período de formação.**

**À Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade do Estado de São Paulo, instituição onde me graduei e me especializei, a qual sempre levarei em minhas memórias, agradeço a todos os professores, em especial ao Prof Pedro Felício Estrada Bernabé que desde o início me apoiou e sempre foi um exemplo.**

**Ao Prof. Dr Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, coordenador geral do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP.**

**Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, coordenador suplente do curso pós-graduação de Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP.**

**As secretárias da pós-graduação Érica A. Pinho Sinhoreti, Raquel Q.M.C.Sacchi e a estagiária Tatiane C. Gava.**

**Ao Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, chefe do Departamento de Odontologia Resturadora da FOP/UNICAMP.**

**Ao Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia, responsável pela área de Endodontia da FOP/UNICAMP.**

**Aos Professores Doutores Alexandre A. Zaia, Brenda P. F. A. Gomes, Caio Cezar Randi Ferraz, Francisco José de Souza-Filho e Luis Valdrighi, professores da área de**

**Endodontia da FOP/UNICAMP, pelos ensinamentos transmitidos e atenção dispensada sempre que solicitada.**

**Aos Professores Doutores Jacks Jorge Júnior, Rogério Heládio Motta e Karina Gonzáles Silvério Ruiz, que participaram da banca examinadora em meu exame de Qualificação.**

**Aos meus estimados amigos, alunos e ex-alunos do curso de Mestrado e Doutorado em Clínica Odontológica, pela amizade e companheirismo.**

**A todos os alunos e ex-alunos de iniciação científica e estagiários e ex-estagiários da área de Endodontia da FOP/UNICAMP, em especial ao Adailton do Santos Lima, pela convivência e auxílio em meus trabalhos diários.**

**A todos que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho**

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram analisar a microbiota de canais radiculares com necrose e com lesão periapical de dentes sintomáticos e assintomáticos; quantificar a presença de endotoxinas; correlacionar a presença de bactérias específicas e a quantidade de endotoxinas com os sinais e sintomas de origem endodôntica; e investigar a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas isoladas dos canais radiculares contra 8 antibióticos, usando o E-test. Amostras microbiológicas foram coletadas de 90 canais radiculares com polpa necrosada e processadas por meio de técnicas microbiológicas. Outras 50 amostras foram obtidas de canais radiculares necrosados, sintomáticos e assintomáticos para realização do teste cromogênico para quantificação das endotoxinas. Análise estatística foi feita pelos testes  $\chi^2$  de Person ou de Fisher. Um total de 400 isolados clínicos foi encontrado, os quais pertenciam a 69 diferentes espécies e 22 diferentes gêneros. Oitenta por cento das bactérias eram anaeróbias estritas e *F. nucleatum* foi a espécie predominante. Canais radiculares de dentes sintomáticos apresentaram uma predominância de anaeróbios estritos e um número maior de espécies por canal radicular em relação aos dentes assintomáticos. Foi observada uma relação entre grupos microbianos específicos, principalmente anaeróbios Gram-negativos e a presença de dor espontânea ou dor prévia, dor à percussão, dor à palpação e edema. Endotoxinas foram encontradas em altas concentrações em canais radiculares de dentes sintomáticos e houve uma correlação positiva entre os sinais e sintomas e a concentração de endotoxinas. Amoxicilina, amoxicilina associada ao ácido clavulânico e cefaclor foram efetivos contra todas as cepas testadas. Os resultados sugerem que bactérias específicas e endotoxinas estão associadas aos sinais e sintomas de dentes com canais infectados e lesão periapical e que, a maioria das espécies anaeróbias testadas foi suscetível aos antibióticos estudados.

**Palavras-chave:** endodontia, endotoxina, microrganismos, sintomatologia, suscetibilidade antimicrobiana

## ABSTRACT

The aim of this study was to analyse the microflora isolated from infected root canals of symptomatic or asymptomatic teeth, to quantify the presence of endotoxins; to correlate the presence of specific bacteria and the amount of endotoxins with endodontic symptomatology; and to investigate the antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria isolated from infected teeth with periapical lesions against 8 antibiotics through the E-test. Microbial samples were taken from 90 root canals of teeth with necrotic dental pulp, and analysed using rigorous culture procedures. Other 50 samples were collected from infected symptomatic or asymptomatic root canals in order to be analysed by a chromogenic test for the endotoxin quantification. Statistical analysis used a Pearson  $\chi^2$  test or a one-sided Fisher's Exact test, as appropriate. A total of 400 cultivable isolates were recovered from 69 different microbial species and 22 different genera. Eight per cent of the bacteria were strict anaerobes and *F. nucleatum* was the most frequently isolated species. Root canals from symptomatic teeth harboured more obligate anaerobes and a larger number of bacterial species than the asymptomatic teeth. Relationships were found between specific microorganisms, especially Gram-negative anaerobes and the presence of pain or history of pain, tenderness to percussion, pain to palpation and swelling. High concentrations of endotoxins were found in root canals of symptomatic teeth and there was a positive correlation between endodontic signs and symptoms and the concentration of endotoxins in infected root canals. Amoxicillin, amoxicillin + clavulanate and cephaclor were effective against all the strains tested. Our results suggested that specific bacteria and endotoxins are associated with endodontic symptoms of infected teeth and that the majority of the anaerobic species tested was susceptible to all antibiotics studied.

**Key words:** endodontics, endotoxin, microorganisms, symptomatology, antimicrobial susceptibility

## Lista de Figuras, Quadros e Tabelas

- Figura 1** Curva padrão utilizada como parâmetro para o cálculo das concentrações de endotoxina das amostras, com base na endotoxina da *Escherichia coli* O111:B4 com uma concentração conhecida de 23 Unidades de endotoxinas (EU.ml-1) Pág 75
- Figura 2** Distribuição de bactérias por canal radicular Pág 83
- Figura 3** Frequência de anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, Gram-positivos e Gram-negativos em canais de dentes com dor espontânea e sem dor no momento da coleta. Pág 84
- Figura 4** Linha de regressão da quantidade de endotoxinas em relação aos sinais e sintomas endodônticos. O eixo vertical indica a) Assintomático; b) dor c) dor à palpação d) Dor à percussão e) edema f) exsudato purulento. Pág 98
- Figura 5** Quantidade de endotoxinas em casos sintomáticos e assintomáticos Pág 99
- Figura 6** Linhas de regressão da quantidade de endotoxinas em relação aos sinais e sintomas endodônticos. O eixo vertical indica a) Assintomático; b) dor c) dor à palpação d) Dor à percussão e) edema f) exsudato purulento. Pág 100
- Quadro 1** Diluição da endotoxina da E. coli para construção da curva padrão Pág 74
- Tabela 1** Frequência, morfologia e coloração de Gram dos microrganismos isolados de 90 canais radiculares. Pág 85

- Tabela 2** Suscetibilidade antimicrobiana dos *Fusobacterium nucleatum* contra 8 antibióticos. Pág 88
- Tabela 3** Suscetibilidade antimicrobiana das cepas *Prevotella intermedia/nigrescens* contra 8 antibióticos. Pág 89
- Tabela 4** Suscetibilidade antimicrobiana das *Prevotella oralis* contra 8 antibióticos. Pág 90
- Tabela 5** Suscetibilidade antimicrobiana dos *Peptostreptococcus micros* contra 8 antibióticos. Pág 91
- Tabela 6** Suscetibilidade antimicrobiana dos *Fusobacterium necrophorum* contra 8 antibióticos. Pág 92
- Tabela 7** Suscetibilidade antimicrobiana dos *Peptostreptococcus prevottii* contra 8 antibióticos. Pág 93
- Tabela 8** Suscetibilidade antimicrobiana das *Porphyromonas gingivalis* contra 8 antibióticos. Pág 94
- Tabela 9** Presença de sinais e sintomas, ufc e quantidade de endotoxinas para cada paciente. \* Assintomático, \*\* Dor à percussão, \*\*\* dor à palpação. Pág 97

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	Pág 1
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	Pág 5
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO</b>	Pág 57
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	Pág 59
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	Pág 79
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	Pág 101
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	Pág 123
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	Pág 125
<b>9</b>	<b>ANEXO</b>	Pág 147

# 1- INTRODUÇÃO

O primeiro pesquisador a descrever a presença de bactérias no interior do canal radicular foi **Miller (1894)** após examinar esfregaços obtidos de canais radiculares com câmara pulpar aberta e polpas necróticas. As bactérias passaram então a serem consideradas os principais agentes etiológicos das doenças pulpares e periapicais, papel este confirmado anos mais tarde por **Kakehashi et al. (1965)** e **Möller et al. (1981)**.

Com o advento de novas técnicas de transporte, isolamento e cultivo de anaeróbios, **Sundqvist, em 1976**, constatou a prevalência de bactérias anaeróbias estritas nos canais radiculares com infecções primárias, o que também foi confirmado por **Griffie et al. (1980)**, **Yoshida et al. (1987)**, **Sundqvist et al. (1989)**, **Hashioka et al. (1992)**, **Gomes et al. (1994a)**, **Gomes et al. (1996a,b)**, **Baumgartner et al. (1999)**, **Villanueva (2002)**.

Os microrganismos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares com infecção primária são os anaeróbios estritos, tais como bactérias dos gêneros *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga* e os facultativos *Streptococcus* e as espécies relacionadas tais como as dos gêneros *Enterococcus* e *Gemella*. Também são isolados com freqüência os gêneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphylococcus*, *Mitsuokella* e *Wolinella*. Ocasionalmente é relatada a presença dos seguintes organismos facultativos: *Enterobacter*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Campylobacter* e *Actinobacillus* (**Morse 1987**, **Sundqvist 1994**). Recentemente, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus*, *Slackia exigua* (antes *Eubacterium exiguum*), *Mogibacterium timidum*

(antes *Eubacterium timidum*) e *Eubacterium saphenum*, bactérias difíceis de serem cultivadas, foram detectadas em canais radiculares infectados por meio de técnicas moleculares (PCR ou sondas de DNA) (**Jung et al. 2000; Siqueira Jr et al. 2000; Hashimura et al. 2001; Gomes et al. 2006a**).

Certas espécies de bactérias anaeróbias estritas, principalmente bacilos produtores de pigmento negro (BPPN) (*Porphyromonas* spp. e *Prevotella* spp.), *Fusobacterium* spp. e *Peptostreptococcus* spp. têm sido associadas a sinais e sintomas de origem endodôntica como dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação, edema e presença de exsudato (**Griffie et al. 1980; Yoshida et al. 1987; Hashioka et al. 1992; Gomes et al. 1994a; 1996a,b; Baumgartner et al. 1999, Jacinto et al. 2003**).

É provável que a atividade proteolítica dos bacilos produtores de pigmento negro (BPPN) seja um fator de virulência de alta significância. Proteinases dessas bactérias têm efeito nas proteínas do plasma envolvidas no processo de defesa do organismo (**Sundqvist et al. 1989**). Os BPPN são comumente isolados em combinação com outras bactérias, o que sugere a existência de sinergismo bacteriano induzindo um aumento no potencial patogênico destas espécies (**Baumgartner et al. 1992; Gomes et al. 1996a; Villanueva, 2002**).

Pesquisas clínicas e laboratoriais têm correlacionado a importância do estudo das bactérias anaeróbias, principalmente as Gram-negativas, nas infecções radiculares e o papel dos componentes celulares como as endotoxinas e outros componentes da parede celular contribuindo para os processos inflamatórios e sintomatologia dolorosa (**Farber & Seltzer, 1988; Horiba et al. 1991**).

Endotoxinas (Lipopolissacarídeos da parede celular de bactérias Gram-negativas) presentes em canais radiculares infectados induzem resposta periapical inflamatória e contribuem para o aumento de substâncias vasoativas e neurotransmissores nas terminações nervosas das áreas de lesão, potencializando a sensação dolorosa (**Seltzer & Farber, 1994**).

Alguns casos de infecções periapicais agudas apresentam sinais e sintomas de disseminação do processo infeccioso, tais como febre, mal estar, edema ou celulite e trismo. Nesses casos, o uso de antibióticos por via sistêmica, atuando como coadjuvante à terapia endodôntica, está indicado (**Bergenholtz & Crawford, 1989; Abbott et al. 1990; Grad, 1997; Andrade, 2002**). Antibióticos podem também ser usados para a profilaxia de infecções em algumas situações como: pacientes de risco à endocardite bacteriana, antes da cirurgia endodôntica, após avulsão e reimplante do dente (**Abbott et al. 1990**).

Os antibióticos não devem ser usados rotineiramente pelas seguintes razões: alergia, toxicidade medicamentosa, interações medicamentosas e desenvolvimento de microrganismos resistentes (**Morse, 1987**). Antibióticos sistêmicos na endodontia só devem ser usados em conjunto com o debridamento mecânico e os processos de drenagem em situações agudas.

A escolha do antibiótico a ser prescrito deve ser baseada em fatores como dados laboratoriais, saúde do paciente, idade, história de alergia, absorção e capacidade de distribuição da droga e nível do plasma sanguíneo. Dados em relação à microbiota e suscetibilidade antimicrobiana são informações cruciais para o clínico (**Kuriyama et al. 2000**). Contudo, os resultados dos exames microbiológicos e dos testes de suscetibilidade

demoram dias para serem obtidos, sendo que, diante da necessidade de se prescrever um antibiótico imediatamente, a escolha deve ser baseada no conhecimento atualizado da microbiologia endodôntica (**Abbott et al. 1990**).

Como os padrões de suscetibilidade das bactérias aos antibióticos de rotina estão sempre mudando devido ao surgimento de bactérias resistentes, é importante que se faça o monitoramento desse padrão por intermédio dos testes de suscetibilidade antimicrobiana, permitindo o desenvolvimento de métodos de ação para um tratamento mais eficaz (**Rosenblatt & Brook, 1993**).

O E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden) consiste em uma fita que contém gradientes de concentração de um determinado antibiótico utilizado para teste de difusão em placas de ágar. É um método semelhante ao método da difusão do disco em ágar, porém tem a vantagem de determinar também a concentração inibitória mínima (CIM) do agente antimicrobiano necessária para inibir o crescimento de um determinado microrganismo. Além disso, é um teste adequado para as bactérias anaeróbias estritas.

Diante disto, os objetivos deste estudo foram estudar a composição da microbiota dos canais de dentes com necrose pulpar e alteração periapical, de dentes sintomáticos e assintomáticos e quantificar a concentração de endotoxina em canais radiculares necrosados. Também se procurou investigar a associação de bactérias específicas e endotoxinas com os sinais e sintomas endodônticos, bem como a suscetibilidade a antimicrobianos comumente empregados na clínica odontológica.

## 2 - REVISÃO DA LITERATURA

### MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES E ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS COM SINAIS E SINTOMAS DE ORIGEM ENDODÔNTICA

Existem várias pesquisas na literatura que analisaram a microbiota endodôntica. No entanto, apenas algumas delas examinaram a associação de bactérias específicas com sinais e sintomas de origem endodôntica, utilizando, principalmente, técnicas de cultura e identificação bacteriana através de métodos bioquímicos tradicionais (**Sundqvist, 1976; Griffie *et al.* 1980; Yoshida *et al.* 1987; Haapasalo, 1989; Hashioka *et al.* 1992; Gomes *et al.* 1994a,b, 1996a,b**).

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação microbiana (“PCR”, “dot-blot hybridization”, “checkerboard DNA-DNA hybridization”), vários autores têm utilizado estes métodos devido à sua alta sensibilidade e habilidade de detectar microrganismos que são muito difíceis de serem cultivados (**Abou-Rass & Bogen, 1998; Baumgartner *et al.* 1999; Bogen & Slots, 1999; Makkar *et al.* 1999; Vafaie *et al.* 1999; Oliveira *et al.* 2000; Jung *et al.* 2000; Siqueira *et al.* 2001a,b; Gomes *et al.* 2006a,b**).

#### Método de cultura

**Sundqvist (1976)** realizou um estudo que representou um marco na literatura endodôntica, pois utilizou técnicas propícias para a identificação de microrganismos anaeróbios estritos. Este autor avaliou microbiologicamente 32 canais radiculares de dentes unirradiculares com polpas necrosadas devido à injúria traumática e com coroas intactas (i.e.

sem cáries ou restaurações). Bactérias anaeróbias estritas representaram cerca de 90% dos isolados. As bactérias mais frequentemente isoladas foram '*Bacteroides melaninogenicus*', *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp. e *Peptostreptococcus* spp.. Foi encontrada uma correlação positiva entre sintomatologia e um maior número de bactérias no canal e entre sintomatologia e a presença de '*Bacteroides melaninogenicus*'. Bactérias apenas foram encontradas em casos de dentes com lesões perirradiculares e houve uma correlação positiva entre o tamanho da lesão perirradicular e o número de espécies bacterianas presentes no canal.

A relação entre '*Bacteroides melaninogenicus*' e canais com sintomatologia também foi estudada por **Griffie et al. (1980)**. Os autores estudaram microbiologicamente 33 canais radiculares de dentes com tecido pulpar necrosado. A presença de '*Bacteroides melaninogenicus*', ou seja, bactérias produtoras de pigmento negro (BPPN) foi associada à dor, formação de fístula e odor fétido, não estando significativamente associada à dor à palpação e ao edema. Por outro lado, nenhuma associação foi encontrada entre BPPN e presença de lesão periapical, dor à percussão, exsudato e localização do dente.

Estudando a microbiota de 36 dentes com lesão periapical, **Yoshida et al. (1987)** associaram a predominância de microrganismos anaeróbios estritos com a sintomatologia endodôntica. Neste estudo, as bactérias mais encontradas em casos clinicamente agudos foram '*Peptococcus magnus*' (atualmente *Peptostreptococcus magnus*) e BPPN, enquanto que *Streptococcus* spp. e bactérias entéricas foram frequentemente isolados de casos assintomáticos.

A prevalência de BPPN foi avaliada por **Sundqvist et al. (1989)** em canais radiculares de 72 dentes com lesão periapical. Destes, 22 continham uma ou mais espécies de BPPN, 95,4% da microbiota desses canais era anaeróbia estrita, sendo que 16 deles estavam associados com abscesso periapical agudo e drenagem purulenta via canal.

**Haapasalo (1989)** investigou microbiologicamente 62 canais radiculares infectados, especialmente em relação à ocorrência, papel e taxonomia dos *Bacteroides* spp.. Todas as infecções, com exceção de uma, foram infecções mistas, dominadas por microrganismos anaeróbios estritos. O autor também notou que os sintomas agudos estavam relacionados com a presença de microrganismos específicos, tais como *Prevotella buccae*, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis*.

**Baumgartner & Falkler (1991)** reportaram que a presença de certos microrganismos, como *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* estava associada com uma incidência maior de alguns sinais e sintomas de origem endodôntica.

**van Winkelhoff et al.(1992)** revisaram o papel da *Porphyromonas endodontalis* nas infecções endodônticas. A presença de *P. endodontalis* em canais radiculares infectados foi correlacionada com sintomas de infecções agudas. Esta bactéria apresenta uma baixa virulência em monoinfecções experimentais, porém exerce um papel importante em infecções aneróbias mistas.

**Hashioka et al. (1992)** investigaram a correlação entre a composição bacteriana de canais radiculares infectados de 28 dentes com sintomas clínicos e lesão periapical. *Peptostreptococcus* e *Porphyromonas gingivalis* foram relacionados com sintomas clínicos e *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* foram relacionados com dor à percussão.

**Gomes et al. (1994a,b, 1996a)** indicaram que poderia haver associações significantes entre grupos particulares de bactérias isoladas dos canais radiculares examinados com alguns sinais e sintomas de origem endodôntica. Analisando os resultados encontrados por **Gomes et al. (1994a)** em 30 canais e em 70 canais (**Gomes et al. 1996a**), notamos que algumas associações do primeiro foram confirmadas no segundo trabalho, tais como a dor e a presença de *Prevotella* e *Peptostreptococcus* spp.; edema e *Prevotella* spp. e *Peptostreptococcus micros*; canais molhados e organismos facultativos, *Prevotella* spp., *Propionibacterium* spp. e exsudato purulento e *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella loescheii*.

**Drucker et al. (1997)**, analisando canais radiculares infectados de 70 pacientes, encontraram associações significantes entre a dor e a combinação de determinadas espécies bacterianas, como: *Prevotella melaninogenica* e *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella* spp. e *P. micros*, *P. melaninogenica* e *Peptostreptococcus* spp., *Prevotella* spp. e *Peptostreptococcus* spp..

**Dougherty et al. (1998)** cultivaram BPPN das porções coronárias e apicais de canais radiculares infectados de 18 dentes extraídos que apresentavam lesão periapical. Nenhuma associação foi encontrada entre BPPN e dor (moderada ou severa) apresentada pelos pacientes ou com os sinais de infecção, como exsudato e edema.

**Baumgartner et al. (1999)** analisaram 40 canais radiculares de dentes intactos com necrose pulpar e periodontite apical com o objetivo de correlacionar a presença de BPPN com os sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes. Utilizaram métodos laboratoriais convencionais, para identificação de cepas de BPPN e “polymerase chain reaction (PCR)”, para diferenciar *Prevotella intermedia* de *Prevotella nigrescens*. Análise estatística dos resultados não encontrou relação significativa entre BPPN e a presença de sinais e sintomas clínicos específicos.

**Gomes (2002)** investigou a microbiota de 100 canais radiculares, dos quais 56 apresentavam polpa necrosada e 44, tratamento endodôntico prévio. Foram isoladas 313 bactérias cultiváveis, sendo 64,22% anaeróbias estritas, 35,78% anaeróbias facultativas, 71,25% Gram-positivas e 28,75% Gram-negativas. Foram encontradas associações entre bactérias anaeróbias, principalmente Gram-negativas e presença de dor, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, canal úmido, exsudato purulento e abscessos periapicais; e entre bactérias Gram-positivas, principalmente as dos gêneros *Enterococcus* e *Peptostreptococcus*, e tratamento endodôntico prévio.

**Peters et al. (2002)** investigaram as combinações entre bactérias isoladas de 58 canais radiculares infectados de dentes com lesão periapical, mas sem sinais e sintomas clínicos. Relações significantes foram encontradas entre *Prevotella intermedia* e *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella oralis*, *Actinomyces odontolyticus* e *Peptostreptococcus micros*, *Bifidobacterium* spp. e *Veillonella* spp. Esses resultados sugerem que patógenos endodônticos não ocorrem aleatoriamente, mas são encontrados em combinações específicas.

**Villanueva (2002)** estudou a microbiota de 28 canais radiculares de pacientes que procuraram tratamento de emergência após início da terapia endodôntica. *Fusobacterium necrophorum* pareceu estar relacionado às formas mais severas de reagudecimento entre sessões do tratamento endodôntico.

**Sousa et al. (2003)** identificaram microrganismos isolados de canais radiculares de dentes que apresentavam abscesso periapical. As amostras foram coletadas dos canais radiculares de 30 dentes que apresentavam abscesso periapical. Métodos de cultura foram utilizados para isolamento e identificação das espécies. Encontraram 117 cepas cultiváveis, sendo 75 anaeróbios estritos e 42 anaeróbios facultativos; 29 Gram-negativos e 88 Gram-positivos. Os microrganismos isolados em maior frequência foram *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus micros* e *Fusobacterium necrophorum* e ainda, os facultativos *Gemella morbillorum* e *Streptococcus mitis*.

**Chavez de Paz et al. (2003)** buscaram uma compreensão mais distinta da microbiota que é capaz de sobreviver ao tratamento endodôntico em dentes com evidências de periodontite apical. Foram coletadas amostras de 200 canais radiculares de dentes com lesão periapical, cujo tratamento do canal radicular havia sido iniciado em uma, duas ou mais sessões prévias. Microrganismos viáveis foram encontrados em 107 canais, havendo uma predominância de microrganismos Gram-positivos facultativos. Tamanho da lesão periapical, dor persistente e uso medicação de  $\text{Ca(OH)}_2$  foram relacionados com a presença de microrganismos. Os achados deste estudo justificam a visão de que *Streptococcus* não-*mutans*, *Enterococcus* e *Lactobacillus* podem sobreviver ao tratamento endodôntico.

**Chaves de Paz et al. (2004)** identificaram microrganismos Gram-positivos coletados de 139 canais radiculares de dentes com lesão periapical cujo tratamento endodôntico já havia se iniciado. Meios de cultura seletivos e cromatografia de gás-líquido foram utilizados para identificar o gênero dos microrganismos Gram-positivos isolados e um gel de eletroforese de sulfato de poliacrilamida foi usado para identificação ao nível de espécies. Um total de 158 bacilos Gram-positivos e 115 cocos Gram-positivos foram isolados na primeira coleta. *Lactobacillus* spp. foi o gênero mais frequentemente isolado (38%). *Olsenella ulli* e *Lactobacillus paracasei* foram as espécies mais isoladas. Nas coletas seguintes, realizadas durante o tratamento, bacilos Gram-positivos foram identificados, porém num número consideravelmente menor. Associações positivas foram encontradas entre membros do gênero *Lactobacillus* e cocos Gram-positivos. Contudo, futuras pesquisas serão necessárias para determinar se esses microrganismos que permaneceram após o tratamento têm implicações no insucesso do tratamento de canal radicular.

**Gomes et al. (2004)** investigaram por métodos de cultura a microbiota de 60 canais radiculares com infecções primárias (n=41) e secundárias (n=19) e a associação das espécies encontradas com os sinais e sintomas endodônticos. Setenta por cento dos isolados (224) eram anaeróbios estritos sendo que os mais frequentes foram *Peptostreptococcus micros* (35%), *Fusobacterium necrophorum* (23,3%), *Fusobacterium nucleatum* (11,7%), *Porphyromonas gingivalis* (6,7%) e *Porphyromonas endodontalis* (5%). Infecções endodônticas secundárias foram caracterizadas por uma microbiota mista com predominância de anaeróbios estritos em contraste com as infecções endodônticas secundárias onde havia de 1 a 2 espécies por canal, em sua maioria anaeróbios facultativos. Associações foram encontradas entre bactérias específicas, em especial anaeróbios estritos e Gram-negativos e os sinais e sintomas endodônticos. Infecções endodônticas secundárias foram associadas a *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus spp.*, *P. micros* e *F. necrophorum*.

**Ferrari et al. (2005)** usaram métodos de cultura para detectar a presença de enterococcus, bactérias entéricas e leveduras em 25 canais radiculares com infecção endodôntica primária, antes e após o preparo do canal radicular. Microrganismos foram isolados em 23 canais radiculares (92%) sendo que 22% deles estavam infectados por *Enterococcus* (13%), bactérias entéricas (4%) ou leveduras (4%).

**Vianna et al. (2005)** utilizaram o método de cultura microbiana para investigar a composição microbiana de 20 canais radiculares com polpa necrótica. Além disso, compararam os resultados com um método de diagnóstico molecular que utiliza um Chip de DNA para a detecção de até 20 espécies bacterianas (The ParoCheck-chip, Greiner, Bio-One

GmbH, Frickenhausen, Alemanha). Os microrganismos mais frequentemente verificados por cultura pertenciam às espécies de *F. nucleatum*, *Gemella morbillorum*, *E. faecalis*, *E. lentum* e *P. acnes*. Já pelo chip de DNA prevaleceram as espécies de *M. micros*, *F. nucleatum*, *T. forsythensis*, *T. denticola*, *V. parvula*, *E. nodatum*, *P. gingivalis*, *A. odontolyticus* e *S. constellatus*. Espécies como *T. forsythensis* e *T. denticola* não foram detectadas por meio da cultura.

**Chu et al. (2005)** compararam os microrganismos cultiváveis presentes em canais radiculares com áreas periapicais radiolúcidas com espaços pulpares expostos (n=45) ou não expostos (n=43) ao meio oral. *Prevotella* spp. foi significativamente mais comum no grupo de espaços pulpares expostos e *F. nucleatum* e *P. acnes* foram significativamente mais comuns nos canais não expostos. Contudo, as semelhanças na comunidade bacteriana destes dois grupos indicaram que a exposição do espaço pulpar pode não ser um fator significativo na determinação dos tipos de bactéria presentes em canais infectados.

## Métodos moleculares

**Bogen & Slots (1999)** usaram o método PCR para detectar a presença de *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* em 20 lesões periapicais fechadas; i.e. com ausência de infiltração coronária na restauração ou cárie dental, bolsa periodontal maior que 4 mm, mobilidade dentária, fístula, fraturas verticais ou comunicação com o seio maxilar; associados a infecções endodônticas persistentes, sintomáticas e assintomáticas. *P. endodontalis*, *P. nigrescens* e *P. intermedia* não foram detectadas em nenhuma das lesões periapicais estudadas. *P. gingivalis* foi isolada em apenas uma lesão periapical que estava associada à dor moderada. Segundo esses autores, BPPN não parecem ser os principais constituintes da microbiota de lesões periapicais de dentes aparentemente não expostos à contaminação oral, ao contrário do que ocorre em infecções periapicais agudas, o que poderia explicar a natureza relativamente estável e crônica da doença.

**Makkar et al. (1999)** não encontraram associação entre *Porphyromonas endodontalis* e dor, edema ou lesão periapical nos 90 canais radiculares de dentes não vitais investigados através de sonda de DNA para *P. endodontalis*.

**Stubbs et al. (1999)** utilizaram 16S rDNA “polymerase chain reaction (PCR)” e subsequente hibridização para distinguir as cepas de *P. intermedia* das cepas de *P. nigrescens* presentes em infecções orais supuradas. *P. nigrescens* foi encontrada mais frequentemente que *P. intermedia* em exsudato de infecções periapicais tanto quando utilizaram o método do

PCR como quando as colônias destas bactérias isoladas por métodos de cultura foram diferenciadas através de métodos moleculares.

Utilizando “DNA-DNA hybridization”, **Gatti et al. (2000)** investigaram a presença de bactérias em 36 lesões periapicais removidas cirurgicamente de pacientes com periodontite apical assintomática. Todas as lesões continham DNA bacteriano. *Actinomyces naeslundii* e ‘*Bacteroides forsythus*’ foram as bactérias mais encontradas. *Bacteroides fragilis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Campylobacter concisus*, *Capnocytophaga ochracea*, *Campylobacter sputorum* ss *sputorum*, *Selonomous noxia*, e *Porphyromonas endodontalis* não foram encontradas em nenhuma lesão periapical.

**Jung et al. (2000)** investigaram microrganismos presentes em 18 canais radiculares de dentes sintomáticos e 20 de dentes assintomáticos utilizando métodos moleculares (PCR e “dot-blot hybridization”). As espécies encontradas em maior frequência foram *Fusobacterium* sp. (68,4%), *Peptostreptococcus micros* (44,7%) e *Porphyromonas gingivalis* (26,3%). BPPN foram encontrados em 42,1% dos dentes incluídos no estudo. Associações significantes foram encontradas nas combinações de ‘*B. forsythus*’ (atualmente *T. forsythia*) / *P. gingivalis* e *P. gingivalis* / *Treponema* sp.. Não foi encontrada nenhuma associação significativa entre qualquer bactéria e sintomatologia. No entanto, *P. nigrescens* foi isolada somente de casos agudos.

**Oliveira et al. (2000)** avaliaram a ocorrência de *P. endodontalis* em 44 infecções endodônticas sintomáticas e assintomáticas usando 16S rRNA-PCR. Quarenta e dois dentes

apresentavam lesão periapical. Em 19 casos com dor à percussão, 2 apresentaram fístula e 6 foram diagnosticados como abscesso periapical agudo. Os demais estavam assintomáticos. *P. endodontalis* foi detectada em 39,5% dos casos, sendo que estava presente em 4 dos 6 casos com abscesso periapical agudo, em 10 casos com dor à percussão e em 6 casos assintomáticos. Embora *P. endodontalis* tenha sido encontrada tanto em casos sintomáticos quanto em casos assintomáticos, sua prevalência relativamente alta em abscessos periapicais agudos sugere que esta bactéria tem potencial para ser um importante patógeno endodôntico.

**Siqueira Jr. et al. (2000)** examinaram a microbiota de 28 canais radiculares infectados utilizando métodos moleculares (Checkerboard DNA-DNA hybridization). O número de espécies bacterianas por canal variou de 1 a 17. As espécies mais prevalentes foram: *B. forsythus* (39,3% dos casos), *Haemophilus aphrophilus* (25%), *Corynebacterium matruchotii* (21,4%), *P. gingivalis* (17,9%) e *Treponema denticola* (17,9%). Nenhuma correlação foi encontrada entre o número de bactérias e os sinais e sintomas. O estudo confirmou o conceito de que as infecções endodônticas são mistas, de etiologia polimicrobiana.

**Xia et al. (2000)** utilizaram PCR com primers específicos para *Prevotella tanneriae* com o objetivo de examinar 118 amostras provenientes de infecções endodônticas. Sessenta por cento das amostras foram positivas para a presença de *P. tanneriae*, sugerindo que *P. tanneriae* é comumente presente em infecções endodônticas e pode ser um patógeno em potencial.

**Hashimura et al. (2001)** investigaram a presença de *Slakia exigua* (antes *Eubacterium exiguum*), *Mogibacterium timidum* (antes *E. timidum*) e *Eubacterium saphenum* em 36 canais radiculares utilizando o método do PCR. Destes 36 casos, 17 apresentavam infecções primárias, sendo que 3 estavam com dor espontânea, 7 com dor à percussão, 3 com fístula, 2 com exsudato e 10 com lesão periapical. Nos casos de infecção primária, não foram encontradas associações significantes entre a sintomatologia clínica e a presença das bactérias estudadas.

**Siqueira Jr. et al. (2001a)** utilizaram PCR para detectar *Treponema denticola* em canais radiculares de 54 dentes com polpa necrosada. *T. denticola* foi detectada em 10 de 29 casos assintomáticos, em 8 de 15 casos com dor à percussão e em 5 de 10 casos com abscesso periapical agudo. Estes achados mostraram que apesar de *T. denticola* não estar associada a nenhum sinal e sintoma de origem endodôntica, pode participar na patogênese das lesões periapicais.

**Siqueira Jr. et al. (2001b)** utilizaram PCR para detectar a ocorrência de 4 BPPN (*P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens*) em 54 canais radiculares infectados. BPPN foram detectados em 59,3% dos dentes examinados e em 80% dos dentes com abscesso periapical agudo. Mais de uma espécie de BPPN foi encontrada em 12 canais. BPPN (especialmente *Porphyromonas* spp.) foram detectados em maior frequência nos dentes sintomáticos, no entanto, eles foram também encontrados em muitos casos de dentes assintomáticos, indicando que não há relação aparente entre a presença de BPPN e sinais e sintomas de infecções endodônticas.

**Moraes et al. (2002)** compararam a eficácia do método de cultura com os métodos moleculares 16S rDNA PCR e checkerboard DNA-DNA hybridization em detectar a presença de *Fusobacterium nucleatum*. Para isso, utilizaram 13 canais radiculares de dentes infectados e com lesão periapical. Não encontraram diferenças entre os 3 métodos na detecção de *F. nucleatum* diretamente das coletas clínicas, a despeito do pequeno número de amostras examinadas e da baixa prevalência do microrganismo observada.

Através do método molecular do nested-PCR (n-PCR) **Baumgartner et al. (2003)** compararam a prevalência de Espiroquetas isoladas de canais radiculares infectados e de exsudado aspirado de abscessos. Também investigaram associações específicas entre as espécies de espiroquetas na microbiota dos canais radiculares. Foi realizada coleta microbiológica de 54 canais radiculares infectados e assintomáticos. Outros 84 pacientes com abscesso sintomático, de origem endodôntica, tiveram o exsudato aspirado. PCR detectou uma quantidade significativamente maior de espiroquetas em abscessos agudos (52/84) que em canais radiculares assintomáticos (20/54). *Treponema socranski* foi a espécie de espiroqueta mais frequentemente detectado (44,9%), seguido de *T. maltophilum*, (29,7%), *T. denticola* (28,9%), *T. pectinovorum* (13,7%) e *T. vincentii* (5,1%). O número de espécies de *Treponema* variou de 1 a 5 por amostra. Associações estatisticamente significantes foram encontradas entre *T. maltophilum* e *T. socranskii*, e também entre *T. maltophilum* e *T. denticola*. Os resultados mostram que espiroquetas estão mais associadas com infecção endodôntica do que se acreditava anteriormente.

**Siqueira & Roças (2003a)** investigaram, utilizando o método do nPCR, a ocorrência de *Campylobacter gracilis* e *Campylobacter rectus* em infecções endodônticas primárias. As amostras foram coletadas de 57 canais radiculares de dentes com lesão cariada, polpa necrosada e evidência radiográfica de lesão periapical (28 lesões periapicais crônicas, 12 casos de periodontite apical aguda e 17 casos de abscesso perirradicular agudo). Em geral, *C. gracilis* foi detectado em 21,1% dos casos, sendo a maioria nos casos de abscesso (23,5%) e *C. rectus* em 23,3% dos casos, a maioria em casos de periodontite apical aguda (33,3%). Não foram encontradas associações específicas entre estas espécies e os sintomas clínicos, porém, os achados sugerem o papel patogênico desses microrganismos nas doenças periapicais.

A ocorrência de *Dialister pneumosintes*, um bacilo Gram-negativo anaeróbio, foi investigada por **Siqueira e Roças (2003b)**. As amostras foram coletadas de dentes abscedados e canais radiculares associados a lesões periapicais sintomáticas ou assintomáticas. O método do PCR foi utilizado para verificar a presença deste e outros 16 microrganismos. *D. pneumosintes* foi detectada em infecções mistas com pelo menos 1 dos outros microrganismos examinados. *D. pneumosintes* foi positivamente associada a *T. denticola*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum*, *P. micros*, *C. rectus*, *P. intermedia*, *T. pectinovorum*, e *T. vicentii*, porém nenhum destes pares de associações foi significativamente relacionado com casos sintomáticos.

**Roças et al. (2003)** investigaram a prevalência de 4 espécies de *Treponema* em infecções endodônticas primárias utilizando o método do nPCR. Foram coletadas amostras de 32 canais radiculares infectados (22 com lesão perirradicular crônica e 10 com

periodontite apical aguda). *T. denticola* foi detectada em 78,1% dos casos (77,3% dos casos assintomáticos e em 80% dos casos sintomáticos), *T. socranskii* em 40,6% (40,9% nos assintomáticos e 40% nos sintomáticos), *T. vincentii* em 15,6% (18,2% nos assintomáticos e 10% nos sintomáticos), *T. pectinovorum* em 13,6%, apenas nos casos assintomáticos. Os resultados sugerem que treponemas orais podem estar implicados na patogênese das doenças perirradiculares.

**Sabeti et al. (2003)** investigaram a presença de Citomegalovirus e Epstein-Barr vírus associados à patologia periapical sintomática. As amostras periapicais foram coletadas de 7 lesões periapicais sintomáticas e 7 assintomáticas, no momento da apicectomia. Reação de Polimerase em Cadeia da transcriptase reversa foi utilizada para identificar a presença desses vírus. Citomegalovirus foi detectado em 7 lesões sintomáticas e em 1 assintomática, Epstein-Barr foi identificado em 6 lesões sintomáticas e em 1 assintomática.

**Siqueira et al. (2004)** compararam os padrões do gel de eletroforese com gradiente de desnaturação de casos de infecções endodônticas sintomáticas (n=11) e assintomáticas (n=12). Análise comparativa dos casos sintomáticos com os assintomáticos revelou que algumas bandas eram comuns a ambos, porém a maioria delas pareceu ser única para cada uma das condições clínicas. Em todos os casos foram encontradas múltiplas bandas. O número médio de bandas para casos sintomáticos foi maior que para casos assintomáticos:  $12,1 \pm 9,4$  (intervalo de 2 a 29) e  $6,7 \pm 2,7$  (intervalo de 2 a 11), respectivamente. Quatro bandas intensas foram excisadas do gel e seqüenciadas, mostrando similaridades às espécies dos gêneros *Campylobacter* (5 em assintomáticos e 3 sintomáticos), *Fusobactérium* (4

sintomáticos), *Acinetobacter* (5 sintomáticos) e *Enterobacteriaceae* (11 assintomáticos e 2 sintomáticos). Estes achados confirmam que infecções endodônticas são polimicrobianas e mostraram que há diferença significativa entre a composição bacteriana predominante de casos sintomáticos e assintomáticos.

**Gomes et al. (2005)** utilizaram cultura e PCR para investigar a presença de *P. gingivalis*, *P. endodontalis*, *P. intermedia* e *P. nigrescens* em infecções endodônticas primárias e secundárias. Por cultura, estas espécies foram detectadas em 13 das 100 amostras enquanto por PCR foram detectadas em 50 de 100. Culturas positivas para esses microrganismos foram obtidas em 22% dos casos de infecções primárias e em 4% das infecções secundárias. Já a detecção por PCR foi de 64% dos casos de infecções primárias e 36% dos casos de infecções secundárias. *P. gingivalis* e *P. endodontalis* foram observadas por cultura em 1% e 0% dos casos e por PCR em 38% e 25% dos casos, respectivamente. A identificação por PCR demonstrou maiores taxas de detecção para *P. intermedia* (33%) e *P. nigrescens* (22%) do que por cultura (*P. intermedia/nigrescens*= 13%). Não foram encontradas associações estatisticamente significantes dessas espécies com os sinais e sintomas endodônticos em nenhuma das metodologias utilizadas.

**Foschi et al. (2005)**, utilizando o PCR, verificaram a presença de *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *T. forsythensis* e *T. denticola* e suas associações com sinais clínicos de diferentes processos patológicos de origem endodôntica em infecções endodônticas primárias e secundárias. *Treponema denticola* e *E. faecalis* foram as espécies mais

encontradas nos dois tipos de infecções sendo significativamente associadas a sintomatologia clínica e processos patológicos assintomáticos, respectivamente.

**Roças et al. (2005)** investigaram a ocorrência e prevalência de espécies bacterianas recentemente renomeadas e de filotipos incultiváveis em casos de lesões perirradiculares sintomáticas. Dos 29 casos selecionados para o estudo, 19 foram diagnosticados como abscessos perirradiculares agudos e 10 como periodontites perirradiculares agudas. Nested ou semi-nested PCR foram utilizados para identificar a presença de 12 diferentes espécies nas amostras. As espécies mais prevalentes foram *Dialister invisus* (em 55% dos casos), *Olsenella uli* (17%), *Granulicatella adiacens* (10%), Clone oral *Synergistes* BA121 e E3\_33 (10%). *Actinobaculum* EL030 e *Prevotella pallens* não foram detectados em nenhum caso. As espécies e filotipos estudados já haviam sido detectadas associadas a doenças periodontais e infecções endodônticas assintomáticas, mas nunca antes a infecções endodônticas sintomáticas, levantando, portanto, a suspeita de um papel dessas espécies e filotipos na patogênese das infecções endodônticas sintomáticas.

**Sassone (2005)** investigou a composição microbiana de infecções endodônticas primárias, e a sua correlação com aspectos clínicos, como presença de dor, fístula, lesão perirradicular. Quarenta espécies bacterianas foram detectadas nos 111 casos por meio da utilização de sondas de DNA e da técnica do Checkerboard DNA-DNA hybridization. Uma média de 22 espécies diferentes por amostra foi encontrada, sendo *E. faecalis*, *C. gracilis*, *L. buccalis*, *N. mucosa*, *P. melaninogenica* e *F. nucleatum sp. vicentii* as mais prevalentes. Houve associações entre dor e a presença de *T. forsythensis*; ausência de fístula e a presença

de *E. faecalis*, *S. anginosus*, *C. sputigena* e *C. gracilis*; casos de lesão periapical maior que 20mm<sup>2</sup> e *S. intermedius* e *A. naeslundii*.

**Sakamoto et al. (2006)** utilizaram a metodologia da análise do TRFLP (Terminal restriction fragment length polymorphism) para investigar a diversidade da microbiota associada com infecções endodônticas sintomáticas e assintomáticas. As espécies detectadas em maior frequência foram *Fusobacterium nucleatum*, *P. micros/Peptostreptococcus* sp. oral clone AJ062/BS044/FG014, *Prevotella* spp., *Dialister* spp., *Mogibacterium* spp., *Lachnospiraceae* oral clone 55A-34, *F. alocis*, *Megasphaera* sp. oral clone CS025/BS073, e *Veillonella* sp. oral clone BP1-85/*Veillonella dispar/V. Parvula. Bacteroides*-like sp. oral clone X083/*Bacteroidales* oral clone MCE7\_20 e *Dialister* sp. oral clone BS016/MCE7\_134 foram detectados apenas em dentes assintomáticos. Por outro lado, *F. nucleatum* tipo 2, *P. intermedia*, *D. pneumosintes* foram exclusivamente detectados em dentes sintomáticos. Os resultados indicaram que a diversidade bacteriana encontrada foi maior do que a previamente descrita quando se utilizava métodos de cultura e a estrutura da microbiota diferiu significativamente entre infecções sintomáticas e assintomáticas.

**Gomes et al. (2006)** investigaram a presença de *T. forsythia*, *T. denticola* e *Filifactor alocis* em canais radiculares com infecções primárias (n=50) ou secundárias (n=50) e presença de lesões periapicais através da técnica do nested-PCR. Também investigaram a associação destes microrganismos com sinais e sintomas endodônticos. Associações foram encontradas entre infecção endodôntica primária e a presença de *F. alocis* e *T. forsythia*; em particular entre dor espontânea e *F. alocis*, edema e *F. alocis*, dor à percussão e *T. forsythia* e

*T. denticola*, exsudato purulento e *F. alocis*, *T. forsythia* e *T. denticola*. Os 3 microrganismos estudados foram mais frequentes nos casos de infecções primárias.

## SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

### Uso de antibióticos sistêmicos

O uso de antibióticos por via sistêmica, nos casos de infecções endodônticas, está indicado apenas quando infecções periapicais agudas apresentam sinais e sintomas de disseminação do processo infeccioso, tais como febre, anorexia, mal estar geral, celulite ou trismo ou na profilaxia antibiótica de pacientes de risco durante a terapêutica endodôntica **(Bergenholtz & Crawford, 1989; Abbott *et al.*1990; Grad, 1997; Andrade 2002).**

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

Em pacientes de risco, a profilaxia antibiótica é recomendada nos seguintes procedimentos endodônticos, de acordo com as recomendações preconizadas pela *American Heart Association*: instrumentação além do ápice dental, cirurgia perirradicular e reimplante de dentes avulsionados **(Dajani *et al.*1997; 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 de 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 tetalgia 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, 2002, 2006**).

Também é importante obter do paciente um relato cuidadoso de histórias de alergia e reações a drogas, junto com o conhecimento dos efeitos colaterais da medicação. Esse paciente deverá ser acompanhado do começo ao fim da antibioticoterapia. Nos casos onde os aspectos clínicos não desaparecem, mudança do antibiótico deve ser considerada. A segunda escolha do antibiótico deve sempre ser baseada no resultado da cultura e na suscetibilidade antimicrobiana das bactérias envolvidas (**Bergenholtz & Crawford, 1989**).

O regime profilático padrão recomendado pela *American Heart Association* consiste em uma única dose de amoxicilina, por via oral. Os antibióticos amoxicilina, ampicilina e penicilina são igualmente efetivos, *in vitro*, contra os estreptococos  $\alpha$ -hemolíticos (*S. sanguis*, *S. parasanguis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. crista*, *S. vestibularis*, *S. mutans*, *S. sobrinus* e *S. acidominimus*), entretanto a amoxicilina é recomendada porque é melhor

absorvida pelo trato gastrointestinal, proporcionando níveis séricos maiores e mais duradouros. A dose recomendada é de 2 g, para ser administrada 1 hora antes dos procedimentos odontológicos (**Dajani et al. 1997; Andrade, 2002**).

Pacientes alérgicos às penicilinas (amoxicilina, ampicilina ou penicilina) devem ser tratados com regimes alternativos. A clindamicina é uma opção recomendada, administrada por via oral, 1 hora antes do procedimento, em uma dose de 600 mg. Azitromicina ou claritromicina também são agentes alternativos para os pacientes alérgicos às penicilinas (**Dajani et al. 1997**). Essas drogas são relacionadas quimicamente a eritromicina, mas possuem um nível sérico maior e mais prolongado, um espectro antibacteriano mais amplo e causam menos efeitos adversos no trato gastrointestinal, quando comparadas à eritromicina (**Chambers & Sande, 1995; Andrade, 2002**).

### **Método de diluição em ágar**

Em estudo de **Yamamoto et al. (1989)**, a suscetibilidade de agentes antimicrobianos usados clinicamente foi avaliada usando 91 cepas de *Eubacterium*, 65 cepas de *Peptostreptococcus* e 54 cepas de *Bacteroides* isoladas de canais radiculares de dentes associados à lesão periapical e sintomatologia aguda. Embora todas as cepas tenham sido suscetíveis à penicilina, os isolados, que não os BPPN, foram menos suscetíveis à tetraciclina, cephem e macrolídeos com várias cepas resistentes. Todas as cepas foram uniformemente resistentes aos aminoglicosídeos. Algumas diferenças na suscetibilidade foram observadas entre as espécies de *Eubacterium* e *Peptostreptococcus*, enquanto

penicilina foi efetiva contra ambas espécies. BPPN apresentaram boa suscetibilidade a todos os agentes, exceto aos aminoglicosídeos. Penicilina foi o antimicrobiano mais efetivo, confirmando sua indicação para tratamento de dentes com periodontite apical aguda.

**Appelbaum et al. (1990a)** encontraram cerca de 50% de cepas de *Prevotella intermedia* resistentes à penicilina, em 27 cepas testadas. Cerca de 60% das cepas de *Prevotella melaninogenica* (n=31) e *Prevotella loescheii* (n=8) foram resistentes à penicilina. *Porphyromonas asaccharolytica* (n=8) e *Porphyromonas gingivalis* (n=2) apresentaram 12% e 100% de resistência respectivamente. Os autores concluíram que esta alta taxa de resistência foi devido à produção de  $\beta$ -lactamase.

**Cullmann et al. (1993)** estudaram a suscetibilidade de microrganismos anaeróbios isolados em hospital universitário contra os seguintes antibióticos: ampicilina, ampicilina + sulbactam, amoxicilina + ácido clavulânico, cefalexina, cefaclor, cefuroxima, cefetamet, clindamicina, doxiciclina e eritromicina. O estudo mostrou que *Bacteroides* spp. encontrados em ambiente hospitalar foram resistentes a maioria dos agentes testados (exceto à clindamicina, amoxicilina + ácido clavulânico e ampicilina + sulbactam), enquanto que os patógenos Gram-positivos foram amplamente atingidos pelos agentes orais testados.

**Roache & Yoshinori (1997)** investigaram a suscetibilidade antimicrobiana de 148 microrganismos, tanto aeróbios quanto anaeróbios facultativos e estritos, isolados de 20 abscessos odontogênicos contra espiramicina e metronidazol. Dentre os anaeróbios, ambos

medicamentos foram efetivos contra espécies de *Prevotella* spp., *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Bacteroides* spp. e *Porphyromonas* spp..

**Boyanova et al. (2000)** utilizaram o método de diluição em agar para avaliar os padrões de resistência de 39 cepas de cocos anaeróbios isolados de infecções pulmonares a penicilina, cefoxitina, clindamicina e metronidazol. Resistência à penicilina foi encontrada apenas em 2 cepas de *Veillonella* spp. E 1 de *P. magnus*. Todos os isolados foram suscetíveis a cefoxitina. 8,6 % dos *Peptostreptococcus* spp. Foram resistentes ao metronidazol. Resistência à clindamicina foi encontrada em 8,6 % das espécies testadas.

**Kuriyama et al. (2000)** estudaram a suscetibilidade antimicrobiana dos principais patógenos identificados em abscessos odontogênicos de 163 pacientes contra 7 antibióticos. Os anaeróbios mais frequentes foram *Peptostreptococcus* spp., BPPN (especialmente *Prevotella* spp.) e *Fusobacterium* spp.. Penicilina foi eficiente contra quase todos os patógenos, todavia não funcionou bem contra espécies de *Prevotella* spp. produtoras de  $\beta$ -lactamase. Cefametazol foi efetivo contra todos os patógenos. Eritromicina não foi efetiva contra estreptococos do grupo viridans (*S. salivarius*, *S. mutans* e *S. mitis*, *S. sanguis* e *S. anginosus*) e a maioria dos *Fusobacterium* spp.. Clindamicina apresentou uma forte atividade antimicrobiana sobre anaeróbios. Minociclina foi efetiva contra quase todos os patógenos. A atividade antimicrobiana da levofloxacina contra estreptococos do grupo viridans não foi eficiente. Concluíram que penicilina continua sendo um antimicrobiano efetivo contra a maioria dos patógenos provenientes de infecções odontogênicas. Cefametazol, clindamicina e minociclina são efetivos contra patógenos que não são suscetíveis à penicilina.

**Lana et al. (2001)** fizeram a análise microbiológica antes e depois da instrumentação de 31 canais radiculares com polpa necrosada. Os gêneros bacterianos encontrados em maior frequência foram *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus*. *Candida* e *Saccharomyces* também foram isolados. Dentre os anaeróbios estritos, 98,1% foram suscetíveis à penicilina G, 96,3% foram suscetíveis à amoxicilina, enquanto que eritromicina e tetraciclina inibiram o crescimento de 59,3% e 92,6% das cepas, respectivamente. Metronidazol foi efetivo contra 96,3% dos anaeróbios estritos. Os resultados comprovaram a eficiência dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, especialmente Penicilina G contra os microrganismos testados.

**Kuriyama et al. (2002)** testaram a suscetibilidade antimicrobiana de aneróbios Gram-positivos isolados de 93 amostras de exsudato purulento proveniente de infecções odontogênicas contra 11 antibióticos. *Streptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp. e *Gemella* spp. foram suscetíveis á maioria dos antibióticos testados. O menor índice de suscetibilidade foi da gentamicina contra *Streptococcus* spp. (70%). Metronidazol apresentou grande atividade antimicrobiana contra cocos Gram-positivos anaeróbios isolados de infecções odontogênicas. Todos os 11 antibióticos estudados mostraram-se efetivos contra as cepas testadas.

## E-test

**Citron et al. (1991)** estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de 105 espécies de bactérias anaeróbias, isoladas clinicamente, contra cefoxitina, cefotaxima, imipenem, penicilina, metronidazol e clindamicina, utilizando os métodos do E-test e diluição em ágar. As CIMs foram interpretadas após 24 e 48 horas de incubação de 58 espécies. Os dois métodos apresentaram correlação positiva em 87% ( $\pm 1$  diluição) e em 89% ( $\pm 2$  diluições) após 24 horas, e em 86% e 97%, após 48 horas de incubação, respectivamente para E-test e diluição. Afirmaram os autores que o E-test é um método fácil de se utilizar e interpretar, é confiável para se testar a suscetibilidade antimicrobiana, além de ser um método adequado para todos os microrganismos anaeróbios.

**Wust et al. (1992)** compararam o método do E-test e diluição em ágar testando 146 isolados clínicos anaeróbios estritos Gram-negativos e Gram-positivos. A leitura dos resultados foi considerada mais confiável quando realizada após 44 horas de incubação. Não foram encontradas grandes discrepâncias entre os dois métodos.

**Nachnani et al. (1992)** avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de 60 cepas de patógenos periodontais (*Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus* e *Capnocytophaga*) pelo método do E-test. Os antibióticos testados foram clindamicina, metronidazol, tetraciclina, ciprofloxacina, cefoxitina e ampicilina. O método de diluição em ágar foi utilizado como controle. Os anaeróbios estritos foram 100% suscetíveis aos antibióticos. Para

os microrganismos facultativos, a suscetibilidade variou de 97% a 100%, menos contra o metronidazol, que teve 75% de suscetibilidade.

**Couroux et al. (1993)** compararam o E-test e o método de diluição em ágar testando 92 cepas de bactérias anaeróbias Gram-negativas (*Bacteroides* spp. e *Porphyromonas* spp.) contra os antibióticos clindamicina, cefoxitina, imipenem e metronidazol. Os resultados dos dois testes foram equivalentes para todos os medicamentos testados, sendo que, para o imipenem, houve uma concordância dos 2 métodos em 91,7% dos testes. Para cefoxitina a relação entre os 2 métodos foi relativamente baixa (67%).

**Pajukanta et al. (1994)** avaliaram o método do E-test para testar a suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *P. gingivalis* isoladas da cavidade oral. As seguintes porcentagens de suscetibilidade foram obtidas: benzilpenicilina 100%; ampicilina 96%; cefaclor 82%, cefuroxime 91%; eritromicina 93%; clindamicina 99%, tetraciclina 66%, doxiciclina 89%, metronidazol 77% e ciprofloxacina 77%. O E-test se mostrou um método aceitável para determinar a suscetibilidade da *P. gingivalis* a maioria dos antimicrobianos.

**Massey et al. (1995)** compararam os métodos do E-test e de diluição em ágar testando 95 cepas de anaeróbios Gram-negativos e 58 de anaeróbios Gram-positivos. A concordância entre os resultados dos dois métodos foi boa, sendo que, em geral, foi maior para os anaeróbios Gram-positivos que para os Gram-negativos.

**Rosenblatt & Gustafson (1995)** testaram 220 bactérias anaeróbias estritas contra 14 agentes antimicrobianos pelos métodos do E-test e diluição em ágar. Os resultados do E-test foram legíveis, após 24 horas, para 64% dos testes, no entanto, após 48 horas, 95% dos testes estavam legíveis. Após 48 horas, houve uma concordância dos resultados dos dois métodos em 97,9% dos testes, enquanto que, após 24 horas, esta concordância foi de 89%.

A suscetibilidade de 201 anaeróbios estritos contra eritromicina, azitromicina, claritromicina e roxitromicina foi testada por **Spangler et al. (1995)** através dos métodos do E-test e diluição em ágar. Claritromicina foi levemente mais efetiva que os outros antimicrobianos e não houve discordância de resultados entre os dois métodos.

Um total de 147 cepas de microrganismos anaeróbios, dentre elas 45 de *Clostridium* spp., 25 de *Peptostreptococcus* spp., 10 de *Propionibacterium* e 67 bacilos Gram-negativos anaeróbios foram testadas por **Duerden (1995)** através do E-test e o teste do disco, para determinar a concentração inibitória mínima de metronidazol, penicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, cefoxitina, imipenem, eritromicina, clindamicina e tetraciclina. As espécies de *Propionibacterium* spp. e uma cepa de *Bacteroides fragilis*, 1 de *Prevotella buccalis* e 1 de *Bacteroides ureolyticus* foram resistentes ao metronidazol (teste do disco). A maioria das cepas foi suscetível ao imipenem. Três cepas de *Clostridium* spp., 2 de *Peptostreptococcus* spp., todas as cepas de *Bacteroides* spp., e um terço das cepas de *Prevotella* spp. e *Porphyromonas* spp. foram resistentes à penicilina, no entanto todas foram sensíveis à amoxicilina + ácido clavulânico.

**Vigil et al. (1997)** estudaram a suscetibilidade antimicrobiana, através do E-test, de 53 microrganismos isolados de lesões periapicais persistentes removidas cirurgicamente contra penicilina G, cefoxitina, cefotaxima, clindamicina, metronidazol, tetraciclina e eritromicina através do E-test. Destas, 29 eram anaeróbios estritos, 19 facultativos e 5 aeróbios. O resultado dos testes de suscetibilidade antimicrobiana não mostrou evidências claras de resistência dentre as espécies testadas contra os antibióticos do estudo.

**Conti et al. (1999)** testaram a suscetibilidade antimicrobiana, através do E-test, de 20 cepas de *Prevotella intermedia/nigrescens* e 19 de *Porphyromonas gingivalis* isoladas de bolsas periodontais. Após 48 horas, as CIMs foram obtidas e estabelecidas para todas as espécies testadas e o padrão de suscetibilidade determinado. Concluíram os autores que o método é reproduzível, prático e sensível para determinar o padrão de suscetibilidade das espécies bacterianas anaeróbias estritas.

**Kleinfelder et al. (1999)** avaliaram a sensibilidade antibiótica dos microrganismos mais prevalentes em doença periodontal avançada. Os microrganismos mais prevalentes foram *F. nucleatum* (38/214), *P. micros* (33/214), *P. oralis* (33/214) e *P. gingivalis* (32/214). Estes microrganismos foram suscetíveis à tetraciclina, metronidazol e amoxicilina mais ácido clavulânico testada através do E-test. Os resultados indicaram que a concentração inibitória mínima (MIC) em todos os casos foi abaixo da concentração alcançada no fluido crevicular gengival. Contudo, resistência foi encontrada para 29% das cepas de *F. nucleatum* contra amoxicilina + ácido clavulânico e para 12%, 3% e 3% das cepas de *P. micros* contra amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e tetraciclina, respectivamente.

**Poulet et al. (1999)** determinaram a suscetibilidade antimicrobiana de 13 cepas de *Prevotella intermedia* ao metronidazol através do E-test. Apesar do pequeno número de cepas avaliadas, foi demonstrada uma ótima atividade do metronidazol contra *P. intermedia*, sendo que as cepas foram 100% suscetíveis a este medicamento.

**Lewis et al. (2000)** estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de 331 cepas isoladas de exsudato purulento aspirado de 78 abscessos endodônticos. O método do E-test indicou que 64 cepas (19%) foram resistentes à penicilina, 31 (9%) foram resistentes à ampicilina e 13 (4%) foram resistentes ao co-amoxiclav. Não houve discrepância destes resultados em relação aos obtidos pelo método de diluição em ágar

**Khemaleelakul et al. (2002)** testaram, através do método do E-test, a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de exsudato proveniente de infecções endodônticas agudas. Foi realizada aspiração do exsudato purulento de 17 pacientes com abscesso periapical agudo e, após o isolamento e identificação dos microrganismos, estes tiveram sua suscetibilidade antimicrobiana testada contra 6 antibióticos. Um total de 127 cepas foi isolado, sendo que os gêneros mais frequentemente encontrados foram *Prevotella* e *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* e *Peptostreptococcus*. As porcentagens de suscetibilidade para cada antibiótico foram: 81% para penicilina V (95/118); 88% para metronidazol (51/58 anaeróbios estritos); 85% para amoxicilina (100/118); 100% para amoxicilina + ácido clavulânico; e 89% para clindamicina (105/118). Os resultados evidenciam que Penicilina V ainda é um medicamento efetivo, porém quando falha, existem outras opções de medicamentos ou associações medicamentosas que poderão ser eficazes.

**Baumgartner & Xia (2003)** testaram a suscetibilidade antimicrobiana de 98 espécies de bactérias anaeróbias estritas isoladas de abscessos endodônticos. O método do E-test foi usado para testar a susceptibilidade destes microrganismos à penicilina V, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, metronidazol e claritromicina. Amoxicilina + ácido clavulânico foi efetiva contra 100% das cepas testadas, enquanto amoxicilina e penicilina V foram efetivas contra 91% e 85% das cepas, respectivamente. Clindamicina foi efetiva contra 96% dos microrganismos. Metronidazol teve a maior porcentagem de resistência bacteriana (55%). Contudo, quando ele foi testado em combinação com penicilina V ou amoxicilina, a suscetibilidade aumentou para 93% e 99% respectivamente.

**Chan & Chan (2003)** usaram o E-test para avaliar a suscetibilidade antimicrobiana de 178 cepas isoladas de pacientes com infecções odontogênicas. Resistência a ampicilina foi encontrada em cerca de 35% dos anaeróbios testados. A amoxicilina teve uma atividade maior, tendo sido efetiva contra 100% dos streptococos do grupo viridans e cerca de 86% dos anaeróbios estritos. Resistência à amoxicilina + ácido clavulânico foi encontrada em 10% dos grupos dos anaeróbios estritos, exceto a *P. gingivalis* que foi 100% sensível. Tetraciclina e eritromicina foram os antibióticos menos efetivos contra os microrganismos testados.

**Letournel-Glomaud et al. (2003)** avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas isoladas de infecções de diversos sítios do corpo humano. Foram testadas 194 cepas (105 Gram-positivas e 89 Gram-negativas) contra benzilpenicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, metronidazol e imipenem. Todas as cepas foram susceptíveis a benzilpenicilina e a amoxicilina + ácido clavulânico. Todas as cepas,

exceto 2 de *Lactobacillus* spp. e 1 de *Veillonella* spp., foram susceptíveis ao Imipenem. 17% dos anaeróbios Gram-positivos e 22% dos anaeróbios Gram-negativos foram resistentes a clindamicina. Metronidazol não foi efetivo contra 51% dos Gram-positivos e foi efetivo contra 98% dos Gram-negativos.

**Pinheiro et al. (2003)** investigaram a suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos isolados em maior frequência de 30 canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico. Os gêneros bacterianos mais encontrados foram *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Actinomyces*. A suscetibilidade antimicrobiana do *Enterococcus faecalis* e *Peptostreptococcus* spp. foi realizada através do E-test. Todas as espécies estudadas foram susceptíveis à benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. Contudo, 20% dos *E. faecalis* foram resistentes à eritromicina e 60% à azitromicina.

**Sousa et al. (2003)** coletaram amostras de 30 canais radiculares associados a abscessos periapicais e avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Fusobacterium necrophorum* e *Peptostreptococcus prevotii* através do E-test. Os antibióticos testados foram: penicilina G, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol, eritromicina, azitromicina e clindamicina. As cepas testadas apresentaram-se sensíveis à penicilina G, amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, metronidazol e clindamicina. 80% dos *F. necrophorum* e 20% dos *P. prevotii* foram resistentes a eritromicina e 60% dos *F. necrophorum* e 20% dos *P. prevotii* foram resistentes a azitromicina.

**Van Winkelhoff et al. (2005)** utilizaram o E-test para investigar os diferentes padrões de resistência antimicrobiana na Espanha e Holanda, comparando os perfis de suscetibilidade antimicrobiana de cinco espécies bacterianas isoladas de pacientes com periodontite. Na Espanha valores de MIC significativamente mais altos foram notados nas cepas de *F. nucleatum* para penicilina, ciprofloxacina, de *P. intermedia* para penicilina, amoxicilina e tetraciclina, de *P. micros* para tetraciclina, amoxicilina e azitromicina, e de *P. gingivalis* para tetraciclina e ciprofloxacina. Baseado nas concentrações inibitórias mínimas, um número mais alto de cepas resistentes na Espanha foi encontrado para *F. nucleatum* contra penicilina, amoxicilina e metronidazol, para *P. intermedia* contra tetraciclina e amoxicilina, e para *A. actinomycetemcomitans* contra amoxicilina e azitromicina. Resistência das cepas de *P. gingivalis* não foi observada para nenhum dos antibióticos testados tanto na Espanha quanto na Holanda.

## **Endotoxinas**

O Lisado de Amebócito *Limulus* (LAL) é usado para detecção de endotoxinas bacterianas associadas com bactérias Gram-negativas. O lisado é preparado através do amebócito circulante do caranguejo em forma de ferradura *Limulus polyphemus*.

O uso do LAL envolvido na detecção de endotoxinas bacterianas foi observado inicialmente por **Bang (1956)** através de uma infecção de bactérias Gram-negativas no caranguejo *Limulus polyphemus* que resultou em uma coagulação intravascular fatal. **Levin**

**& Bang (1964a)** mais tarde demonstraram que esta coagulação foi o resultado de uma ação entre a endotoxina e uma proteína coagulável presente no amebócito circulante do sangue do *Limulus*. Seguindo o desenvolvimento de um anticoagulante adequado para o sangue do *Limulus*, **Levin & Bang (1964b)** prepararam um lisado do lavado do amebócito que foi um indicador extremamente sensível à presença de endotoxina. **Solum (1970)** e **Young et al. (1972)** purificaram e caracterizaram a proteína coagulável do LAL e mostraram que a reação da endotoxina com o LAL é enzimática.

O primeiro teste de LAL comercialmente disponível foi o Gel Clot. Em 1977, a FDA (Food and Drug Administration for Evaluation and Research) estabeleceu um lisado padrão de referência usado para estabelecer a sensibilidade de cada lote de lisado produzido para comercialização. Atualmente existem quatro metodologias aprovadas pela FDA, sendo uma delas o QCL-1000 (Quantitative Chromogenic Lysate), que foi o primeiro teste LAL quantitativo introduzido e é uma metodologia rápida para a detecção e quantificação de endotoxinas bacterianas, reuendo apenas 16 minutos de incubação.

Endotoxinas são antígenos fracos e não-específicos que são fracamente neutralizados por anticorpos. Elas são capazes de ativar o sistema complemento em cascata sem a presença de um anticorpo. A parede celular de bactérias Gram-negativas como as *Prevotella/Porphyromonas* ou *Fusobacterium* contém endotoxinas, que são moléculas estáveis ao calor compostas de polissacarídeos e fosfolipídeos (**Farber & Seltzer 1988, Seltzer & Farber 1994**).

Walter T.J. Morgan e Lydia Mesrobeanu, ambos do Instituto Lister em Londres, deram o primeiro grande passo na análise da composição química da endotoxina entre 1930 e 1940 (**Westphal, 1975**). Esses pesquisadores concluíram que a toxina presente nas bactérias Gram-negativas examinadas continha polissacarídeos (açúcares polímerizados), lipídeos (complexos contendo ácidos graxos) e proteínas. Em 1943 este produto tóxico, constituído principalmente de polissacarídeos e lipídeos, foi denominado de lipopolissacarídeo (LPS), enfatizando sua estrutura química. Posteriormente, ficou demonstrado que todas as bactérias Gram-negativas, e somente esses microrganismos, apresentam as endotoxinas.

O LPS está composto por três segmentos covalentemente ligados: o Lipídio A, o Core e o Antígeno O. A atividade tóxica da endotoxina é atribuída ao Lipídeo A (**Rietschel and Brade 1992**).

Além da estrutura química, muito se tem estudado sobre o mecanismo de ação das endotoxinas. Uma vez que, estando livres para agir, as endotoxinas não ocasionam lesões celulares ou teciduais diretamente, mas sim estimulam células competentes a liberarem mediadores químicos (**Farber & Seltzer 1988**).

Na Odontologia, a partir da década de 80, os avanços nas técnicas de cultura e identificação microbiana demonstraram que, em canais radiculares de dentes com tecido pulpar necrosado e reação periapical crônica, predominam os microrganismos anaeróbios, particularmente os Gram-negativos, que além de possuírem diferentes fatores de virulência e

gerarem produtos e sub-produtos tóxicos aos tecidos apicais e periapicais, contêm endotoxinas em sua parede celular (**Sundqvist et al 1989, Gomes et al. 1994a,b**).

A endotoxina é liberada durante a multiplicação ou morte bacteriana, exercendo uma série de efeitos biológicos importantes, que conduzem a uma reação inflamatória (**Rietschel and Brade 1992**) e reabsorções ósseas na região periapical (**Chen & Yan 2001, Jiang et al. 2003**). O LPS ativa também o fator de Hageman (fator XII da cascata da coagulação), induz febre (**Horiba et al. 1992**), ativa o sistema complemento (Contran et al 1991, **Horiba et al. 1992**), atuando em eventos da resposta inflamatória como aumento da permeabilidade vascular, quimiotaxia para neutrófilos e macrófagos, liberação de lizozima e linfocinas (**Morrison & Kline, 1977**), ativa o ciclo do metabolismo do ácido aracdônico, é mitogênico para linfócitos B e provoca degranulação de mastócitos (**Mc Gee et al. 1992**).

Em canais radiculares infectados, a endotoxina pode contribuir para uma elevação na liberação de substâncias vasoativas e neurotransmissores na região das terminações nervosas dos tecidos periapicais, conduzindo a ocorrência de dor (**Seltzer & Farber 1994**). Nos últimos anos, inúmeros trabalhos de pesquisa utilizando diferentes metodologias *in vivo* e *in vitro*, têm salientado a importância das bactérias anaeróbias e das endotoxinas na etiologia das reações periapicais crônicas e agudas (**Schein & Schilder 1975, Dahlen & Hofstad 1977, Dahlén & Bergenholtz 1980, Dwyer & Torabinejaad 1981, Pitts et al. 1982, Schonfeld et al. 1982, Horiba et al. 1991, Yamasaki et al. 1992, Murakami et al. 2001, Jiang et al. 2003**).

O conteúdo de endotoxinas em dentes indicados para tratamento endodôntico foi quantificado por **Schein & Schilder (1975)**. Quarenta dentes, após isolamento absoluto e

remoção do tecido cariado, abertura coronária, tiveram seus canais radiculares inundados com água apirogênica. Os canais foram explorados com limas tipo Kerr até o terço apical e 0,1 mL do fluido foi aspirado dos canais radiculares. A determinação de endotoxina foi feita pelo teste do lisado de *Limulus*. Os dentes com polpa necrosada tinham uma concentração mais alta de endotoxina que os dentes com polpas vitais. Os dentes sintomáticos também apresentavam mais endotoxinas que os assintomáticos.

**Dahlén & Hofstad (1977)** estudaram a atividade endotóxica de lipopolissacarídeos (LPS) extraídos de alguns microrganismos isolados de canais radiculares de dentes de macacos, nos quais a necrose e patologia periapical havia sido induzida experimentalmente. O LPS foi retirado de cepas de *Bacteroides oralis*, *Fusobacterium necrophorum* e *Fusobacterium nucleatum* e injetado no tecido subcutâneo de coelhos para verificar a produção de reação inflamatória da pele. As soluções de LPS também foram utilizadas para induzir quimiotaxia leucocitária em tecido subcutâneo de ratos. O LPS do '*B. oralis*' mostrou uma habilidade consideravelmente menor de causar inflamação cutânea que o do *Fusobacterium*. Contudo, o efeito leucocitário da solução de LPS determinado pelo método da câmara de cicatrização em ratos foi aproximadamente na mesma proporção. Este estudo mostrou que LPS pode ser isolado a partir de bactérias Gram-negativas, que infectam o canal radicular, e que este LPS pode ter grande importância na patogênese das doenças periapicais.

**Wesselink et al. (1978)** tentaram estabelecer, através de um modelo experimental que simulava um canal radicular, a quantidade de endotoxina que poderia afetar o tecido subcutâneo. O modelo consistia de um tubo de polietileno, fechado nas duas extremidades e

com duas pequenas aberturas laterais, que foi implantado subcutâneamente em um coelho após ter sido preenchido com solução de endotoxina de *E. coli* em diferentes concentrações nos três grupos (1mg, 1µg e 1ng). Um tubo vazio implantado no mesmo animal serviu como controle. O segundo estágio da reação local de Shwartzman (agregação de células sanguíneas e plaquetas obstruindo a luz de pequenos vasos, danos às paredes dos vasos, hemorragia, alto número de granulócitos eosinofílicos e necrose tecidual) foi usado para detectar até mesmo as mais leves alterações teciduais causadas por pequenas quantidades de endotoxina. Tanto para os grupos experimentais quanto para o grupo controle, a análise microscópica da região do tubo implantado mostrou acúmulo de células sanguíneas e resquícios teciduais ao longo das paredes dos tubos. A comparação do tecido ao redor dos tubos implantados não mostrou diferença qualitativa, apenas uma diferença quantitativa entre a reação tecidual dos tubos experimentais e dos tubos controle.

A resposta imunológica em ratos após a inoculação de lipopolissacarídeos (LPS) foi estudada por **Dahlén** em **1980**. O LPS foi extraído de cepas de *Fusobacterium nucleatum* (Fus-MC8) e '*Bacteroides oralis*' (Bact-MC3). Soluções destes LPS foram injetadas na veia lateral dos ratos. Em outro grupo, após abertura coronária e remoção da polpa de incisivos inferiores de ratos, o canal foi inundado com 25µl de solução de LPS (500µg/ml) e o procedimento foi repetido semanalmente por 5 semanas em 4 ratos de cada grupo. Os ratos foram sacrificados 5 dias após a administração de LPS, o sangue foi coletado por punção no coração e o baço foi assepticamente dissecado e congelado, sendo o mesmo realizado com os linfonodos regionais. Alguns dentes foram extraídos em bloco para análise histológica. Tanto o LPS do *Fusobacterium nucleatum* quanto do '*Bacteroides oralis*' mostraram uma

rápida resposta para IgM no baço, porém esta resposta foi mais lenta nos linfonodos submandibulares. No caso do LPS Bact-MC3, a resposta nos linfonodos aumentou com a estimulação prolongada. Em comparação com a resposta para IgM, a resposta para IgG foi mais lenta e mais fraca para o LPS do *Bacteroides*, enquanto foi amplamente detectada para o LPS do *Fusobacterium*. Os cortes histológicos mostraram que após 5 dias da aplicação de LPS houve resultados similares para o Bact-MC3 e Fus-MC8. Formação de abscesso com infiltrado de neutrófilos e granulocitos foi freqüentemente observada, bem como a necrose da região apical da polpa. A principal conclusão deste estudo é que antígenos de microrganismos orais aplicados localmente podem estimular resposta imune tanto dos linfonodos como do baço, resultado em anticorpos circulantes. A força, o desenvolvimento prolongado e a natureza desta resposta parecem depender das características químicas do antígeno.

**Dahlén & Bergenholtz (1980)** investigaram a atividade endotóxica dos conteúdos de canais radiculares com tecido pulpar necrosado utilizando o teste do *Limulus* e, relacionaram esta atividade à quantidade de bactérias viáveis isoladas. Foram coletadas amostras de 13 canais radiculares de dentes monorradiculares superiores com tecido pulpar necrosado. Após realização do isolamento absoluto e abertura coronária os canais radiculares foram inundados com 15 – 25 µl de NaCl 0,43% e as paredes dos canais radiculares foram debridadas mecanicamente até o ápice com lima Hedströen. A suspensão foi aspirada com uma seringa, o volume foi registrado e transferido para 1ml de NaCl 0,43% apirogênico. Os autores observaram que quanto maior o número de bactérias Gram-negativas nas amostras, maior a concentração de endotoxinas. A quantidade de endotoxinas encontrada nos canais

radiculares sugere que o LPS pode ter uma significância biológica para o desenvolvimento da inflamação periapical.

**Dahlén et al. (1981)** realizaram um estudo histológico e histoquímico da influência do lipopolissacarídeo (LPS), extraído e purificado do *Fusobacterium nucleatum*, nos tecidos periapicais de macaco *Macaca fascicularis*. A amostra constituiu-se de 27 canais radiculares de 4 macacos. Um volume de 5 a 10µl da solução de LPS foi introduzido no canal radicular com uma seringa e conduzido com uma lima até a região periapical do dente devidamente isolado. Uma bolinha de algodão embebida na solução do LPS foi colocada na câmara pulpar e o acesso foi selado com cimento de óxido de zinco e eugenol. Os dentes foram observados por três meses (Grupo I, 18 dentes) e sete meses (Grupo II, nove dentes). Dezesete dentes foram utilizados como controle. Foi observada reação inflamatória nos tecidos periapicais de todos os dentes experimentais, com reabsorção óssea e dentária. Mesmo quando a inflamação era moderada, as células do osso apical apresentavam aumento da atividade enzimática, sugestivo de reabsorção óssea ativa. As células do grupo controle apresentaram pouca ou nenhuma reação enzimática.

**Dwyer & Torabinejad (1981)** estudaram radiográfica e histologicamente o efeito da endotoxina sobre os tecidos periapicais de dentes de gatos, utilizando a endotoxina da *Escherichia coli* 0111:B4 liofilizada. Injetaram solução de endotoxina em cada canino previamente preparado de 6 animais, nas concentrações de 100ug/ml, 10 ug/ml e 1ug/ml, e solução salina (controle). Três animais foram submetidos aos mesmos procedimentos previamente descritos, porém utilizando-se endotoxina detoxificada. Como um controle

adicional, solução salina foi injetada nos 4 caninos de um animal. Decorridos os períodos experimentais (2, 4 ou 6 semanas) os animais foram sacrificados. Áreas radiolúcidas relativamente extensas foram observadas nas radiografias dos dentes injetados com endotoxina em todos os períodos (2, 4 e 6 semanas). Nos casos onde foi injetada solução salina ou endotoxina detoxificada as áreas radiolúcidas periapicais eram muito pequenas ou ausentes. Histologicamente, a inflamação foi mais intensa nos dentes injetados com endotoxina pura que naqueles preenchidos com solução salina ou endotoxina detoxificada. A técnica da imunodifusão dupla não demonstrou a formação de anticorpos no soro colhido. Os resultados suportaram a conclusão que a endotoxina bacteriana tem um papel na produção de lesões periapicais inflamatórias.

**Warfvinge et al. (1985)** investigaram a capacidade de produtos da parede celular, principalmente os lipopolissacarídeos, de vários microrganismos em induzir lesões inflamatórias na polpa dental através da dentina exposta. Foram utilizados LPS extraídos de '*Bacteroides oralis*' e *Veillonella parvula* e, material da parede celular de *Lactobacillus casei*. Soro de albumina bovina cristalizada (BSA) foi usado para controle. Cavidades classe V foram preparadas em 64 dentes de 3 macacos adultos, padronizando a espessura de dentina remanescente em menos de 1mm. Após aplicação de EDTA 15%, endotoxina liofilizada era reconstituída com soro fisiológico e então aplicada na base da cavidade. As cavidades foram seladas com cimento de óxido de zinco e eugenol. As respostas dos tecidos pulpares foram observadas histologicamente após 8 ou 72 horas do início do experimento. Na região subjacente aos túbulos dentinários, materiais bacterianos induziram infiltração de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) no tecido pulpar da maioria dos dentes testados. As respostas

foram similares para os três materiais bacterianos testados nos dois períodos avaliados. A aplicação do BSA como controle induziu significativamente menor acúmulo de PMNs. Análise dos dados indicou que complexos de alto peso molecular da parede celular dos microrganismos podem afetar o tecido pulpar através da dentina exposta.

**Pitts et al. (1982)** avaliaram o papel da endotoxina sobre os tecidos apicais e periapicais de 16 dentes de 2 cães adultos. Doze dentes foram instrumentados ao nível do delta apical e os 4 dentes restantes foram submetidos ao arrombamento apical. Metade dos canais radiculares de cada grupo foram preenchidos com 0,1 ml da solução de endotoxina de *Salmonella minnesota* R-595, os demais foram preenchidos com solução salina. Semanalmente por 4 semanas no Grupo I e 5 no Grupo II, as soluções (endotoxina e salina) foram renovadas no interior dos canais radiculares. As alterações radiográficas e periapicais ocorridas foram mais severas nas raízes contendo endotoxinas do que nas raízes contendo solução salina. A avaliação histológica também demonstrou maior destruição óssea periapical e maior resposta inflamatória nos espécimes contendo endotoxinas. Os autores concluíram que as endotoxinas podem desempenhar um papel de fundamental importância na inflamação periapical e na destruição óssea.

**Schonfeld et al. (1982)** investigaram a presença de endotoxinas em lesões periapicais com características histopatológicas de granulomas crônicos. As amostras foram obtidas de dentes sem envolvimento periodontal no momento da realização de apicectomia. As amostras eram seccionadas, sendo uma parte fixada para análise histológica e a outra congelada para análise da presença de endotoxinas. Trinta amostras foram examinadas histologicamente. Foi

utilizado o método do lisado de amebócito de *Limulus* (LAL) para a detecção da endotoxina. Em 75% das lesões diagnosticadas como granulomas foi encontrada a presença de endotoxinas, enquanto que apenas 20% dos tecidos não inflamados continham endotoxina, havendo desta forma, uma correlação ( $p = 0.015$ ) entre a presença de endotoxinas e a presença de inflamação nos tecidos periapicais. Os resultados indicaram que as endotoxinas bacterianas, presentes nos canais radiculares de dentes com tecido pulpar necrótico estão, de fato, presentes na região periapical de dentes com granuloma periapical. A presença destes produtos nos tecidos periapicais pode contribuir para a ocorrência de doenças periapicais mesmo sem a presença de bactérias.

**Pinero et al. (1983)** usaram culturas de fibroblastos pulpare de dentes humanos ou bovinos para detectar o efeito das endotoxinas (5 a 625 ug/ml) na síntese de DNA, colágeno e glicosaminoglicanos sulfatados e não-sulfatados. Isto foi feito mediando a captação de H-timidina, C-prolina, S-sulfato de sódio e C-glucosamina por fibroblastos em produzir as respectivas macromoléculas e liberá-las no meio. Fibroblastos da polpa humana atingiram picos na utilização de prolina, sulfato e glucosamina quando estimulados com 5µg/ml de endotoxina, enquanto os fibroblastos bovinos atingiram picos com a utilização dos mesmos isótopos com 125µg/ml. Os resultados sugeriram que os fibroblastos pulpare são capazes de responder a baixos níveis de endotoxina através do aumento da divisão celular e síntese da matriz do tecido conjuntivo.

Com o objetivo de analisar os efeitos da endotoxina sobre os tecidos periapicais de dentes de cães, **Mattison et al. (1987)**, utilizaram endotoxina de *Eikenella corrodens* 23834,

e de *Escherichia coli* 055:B5, diluídas em água destilada, na concentração de 10 µl/ml. Após a realização do exame radiográfico periapical padronizado, 28 dentes (56 raízes) de 7 cães adultos, foram submetidos à abertura coronária, pulpectomia e odontometria e preparo biomecânico com arrombamento apical. Quarenta e duas raízes foram preenchidas com 0,1 ml de endotoxina de *E. corrodens*, 8 raízes com endotoxina de *E. coli* e 6 raízes com água destilada. Este procedimento foi repetido, semanalmente, durante 4 semanas. Radiograficamente, 90,4% das raízes tratadas com endotoxina de *E. corrodens* e 75% das raízes tratadas com endotoxina de *E. coli* exibiram lesões periapicais. As 6 raízes preenchidas com água, por 4 semanas, apresentaram leve espessamento do ligamento periodontal, pouco discernível. A análise histopatológica evidenciou reação inflamatória, reabsorção óssea periapical e reabsorção radicular externa significantes, proliferação vascular, edema e infiltrado inflamatório intenso nos dentes preenchidos com endotoxina de *E. corrodens* e *E. coli*. Os resultados deste estudo sugerem que a iniciação e perpetuação da inflamação e da reabsorção óssea periapical em dentes infectados pode ser mediada pela endotoxina da microbiota Gram-negativa.

**Horiba et al. (1989)** investigaram a citotoxicidade do LPS purificado de '*Bacteroides gingivalis*', *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*, isolados de canais radiculares infectados, contra duas linhagens de células mesenquimais, fibroblastos L-929 e WI-38, e duas linhagens de células epiteliais, KB e HeLa S-3. A inibição do crescimento celular por esses LPSs foi considerável para linhagens de células mesenquimais, mas para linhagens de células epiteliais essa inibição foi branda. Cada LPS purificado de '*B. gingivalis*', *F. nucleatum* e *V. parvula*, nas concentrações de 100 µg/ml ou 250 µg/ml, inibiu mais

fortemente o crescimento dos fibroblastos L929 e, em seguida, também inibiu o crescimento dos fibroblastos WI-38. A inibição das células da linhagem epitelial, KB e HeLa S-3, não ocorreu quando foi usado LPS na concentração de 100 µg/ml e quando foi adicionado LPS na concentração de 250 µg/ml ocorreu leve inibição do crescimento celular.

**Horiba *et al.* (1990)** estudaram a distribuição de endotoxinas nas paredes dentinárias de canais radiculares infectados e sadios. Amostras da parede dentinária até o lado cementário de 30 dentes extraídos (5 sadios e 25 com canais infectados) foram preparadas por um método abrasivo. As raízes foram seccionada vertical e transversalmente de modo a se obter blocos de raiz com aproximadamente 1 mm<sup>2</sup>. Então, com o método abrasivo obtiveram séries de pó de dentina de cada espécie. O pó de todos os espécimens foi pesado e 1ml de água apirogênica foi adicionado ao pó de dentina. O conteúdo de endotoxina foi extraído das amostras com ácido cítrico e um método colorimétrico foi utilizado para quantificar esta endotoxina. O conteúdo de endotoxina foi significativamente maior nos dentes com canais radiculares infectados que nos dentes sadios. Nos dentes com canais radiculares infectados, o conteúdo de endotoxina foi maior nas amostras da superfície pulpar de dentina (até 30 µm de profundidade) que nas profundidades de 301 a 800 µm das amostras. O conteúdo de endotoxina das amostras de dentes com áreas periapicais radiolúcidas foi significativamente maior que nos dentes com áreas periapicais normais. Nenhuma diferença significativa, em relação ao conteúdo de endotoxina, foi encontrada em qualquer nível, quando os conteúdos obtidos de dentes com dor à percussão foi comparado com aqueles sem dor.

**Horiba et al. (1991)** avaliaram a correlação entre o conteúdo de endotoxinas e sintomas clínico-endodônticos como: dor espontânea, dor à percussão, exsudato ou áreas radiolúcidas. Pontas de papel absorvente estéreis foram introduzidas por um minuto na região apical de 30 dentes monorradiculares com periodontite apical, para absorver o exsudato e microrganismos e então, foram armazenadas em soro fisiológico livre de endotoxina. A presença de endotoxina foi detectada pelo método de formação de gel. Endotoxina foi detectada nos 16 dentes sintomáticos e em 4 dos 14 dentes assintomáticos, em 19 dos 22 dentes com área radiolúcida e em 19 dos 20 dentes com exsudato. O estudo indicou uma correlação positiva entre a presença de endotoxinas e os sintomas clínicos ou áreas radiolúcidas. Tal correlação sugere que um aumento no nível de endotoxina em canais radiculares infectados pode estar associado com um aumento da inflamação periapical.

**Yamasaki et al. (1992)** quantificaram as endotoxinas e identificaram as bactérias Gram-negativas coletadas de lesões periapicais induzidas em ratos. As polpas dos primeiros molares inferiores foram expostas ao meio oral para que fossem infectadas. O tempo de sacrifício dos animais variou de 1 a 70 dias. A quantidade de endotoxina foi obtida dos molares direitos, enquanto que o número de colônias foi obtido da mesma região no lado esquerdo. A endotoxina foi obtida por um método cromogênico (Endospecky). No grupo controle (dentes sadios), a quantidade de endotoxina no tecido periapical não sofreu variação em nenhum dos períodos do experimento e nenhuma bactéria Gram-negativa foi isolada. Nos animais experimentais, a quantidade de endotoxina nos tecidos periapicais aumentou gradualmente de 1 a 70 dias e o seu nível foi significativamente maior que no grupo controle após 7 dias. Bactérias Gram-negativas foram isoladas dos tecidos periapicais e seu número

aumentou nos tempos experimentais de 1 a 14 dias (26 a 82%), mas diminuiu aos 21 dias. Os resultados deste estudo mostraram que a quantidade de endotoxinas nos tecidos periapicais aumentou progressivamente com o tempo, ao passo que o número de bactérias Gram-negativas isoladas da mesma região não teve um aumento proporcional ao aumento da quantidade de endotoxinas.

**Nakane et al. (1995)** investigaram os efeitos do lipopolissacarídeo (LPS) nas células da polpa dental. Dentes humanos recém-extraídos foram seccionados ao seu longo eixo para remoção do tecido pulpar. Amostras de LPS foram purificadas de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Fusobacterium nucleatum* isolados de canais radiculares infectados. As células da polpa foram tratadas com 1, 10 e 100 µg/ml de LPS. Os efeitos do tratamento foram medidos pelo conteúdo de DNA, conteúdo protéico e atividade de fosfatase alcalina das células. Na concentração de 1µg/ml nenhum dos LPSs causaram qualquer alteração na produção de DNA ou proteína, enquanto que a quantidade de DNA aumentou na concentração 10 µg/ml do LPS e foi inibida na concentração de 100 µg/ml. A síntese protéica foi diminuída pelos LPS tanto a 10 como a 100 µg/ml. A atividade da fosfatase alcalina não se alterou em nenhuma concentração de LPS testada.

**Gilles et al. (1997)** relacionaram a perda óssea dental induzida por lipopolissacarídeos ou interleucina-1 com a deficiência de estrógeno, uma vez que a perda óssea alveolar associada à periodontite ocorre frequentemente em ratas com predisposição para osteoporose. Citokina interleucina-1 ou LPS de *Campylobacter rectus*, considerados potentes indutores de reabsorção óssea, foram administrados em ratas ovariectomizadas. Os canais distais dos

primeiros molares inferiores foram instrumentados com limas endodônticas e LPS ou interleucina-1 foram depositados e selados no canal radicular. Radiografias das perdas ósseas periapicais foram avaliadas através de um programa de análise para determinar o tamanho da lesão. Tanto interleucina-1 quanto LPS do *C. rectus* causaram um aumento significativo da reabsorção nos animais ovariectomizados quando comparados com os animais não-ovariectomizados. O LPS, neste modelo, produziu um aumento significativo na reabsorção em relação ao grupo controle (canais que receberam apenas o veículo aquoso, sem a endotoxina), tanto no grupo dos animais ovariectomizados quanto no outro grupo.

**Matsushita et al. (1999)** examinaram a indução de interleucina-1b(IL-1B), IL-6 e IL-8 pelos lipopolissacarídeos de diversas espécies de bactérias produtoras de pigmento negro. Os estudos foram realizados em culturas de sangue humano de 6 pacientes (dois de cada grupo) que apresentavam números diferentes de lesões periapicais (i.e. pacientes com área radiolúcida periapical em 10 ou mais dentes (Grupo I n=4), em 1 ou 2 dentes (Grupo II n=6), e 6 voluntários saudáveis, sem lesão periapical (controle). O LPS da *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Porphyromonas gingivalis* 381, e *Porphyromonas endodontalis* ATCC 27067 induziram elevada resposta de IL-8 nos indivíduos do grupo I comparado com os indivíduos dos outros grupos. O LPS da *P. gingivalis* reagiu fortemente com os soros do Grupo I. De modo que, o LPS de bactérias produtoras de pigmento negro pode estar envolvido na periodontite apical por induzir citocinas específicas e/ou resposta imune humoral.

**Khabbaz et al. (2000)** determinaram a presença ou ausência e a quantidade de endotoxinas nas camadas superficiais e profundas de lesões cáries de dentes sintomáticos

e assintomáticos com tecido pulpar vital. Quantidades iguais (aproximadamente 6 mg) de dentina cariada (superficial e profunda) foram retiradas sob condições assépticas de dentes sintomáticos com pulpíte irreversível (n=9) e dentes assintomáticos com pulpíte reversível (n=11). Foi utilizado um método cromogênico quantitativo usando Lisado de *Limulus* LAL (QCL-1000) para determinar a quantidade de endotoxinas. Os resultados indicaram que endotoxinas estavam presentes nas camadas superficial e profundas das cáries de todos os dentes sintomáticos com pulpíte irreversível, sendo a quantidade de endotoxinas significativamente maior nas camadas superficiais em relação às camadas profundas. Quantidades significativamente maiores de endotoxinas estavam presentes nas camadas superficiais e nas camadas profundas de dentina cariada de dentes sintomáticos em relação aos dentes assintomáticos. Na dentina saudável nenhuma endotoxina foi detectada.

**Khabbaz *et al.* (2001)** investigaram a presença de endotoxinas no tecido pulpar de dentes sintomáticos e assintomáticos. Quantidades iguais de tecido pulpar (aproximadamente 8 mg) foram coletadas, com o auxílio de um extirpa-nervos, de 28 dentes monorradiculares cariados, sendo 15 sintomáticos e 13 assintomáticos. Também foram coletadas amostras de 5 dentes monorradiculares hígidos, como controle. O método utilizado para quantificar as endotoxinas foi o método quantitativo cromogênico LAL-1000. Endotoxinas foram detectadas em todos os tecidos pulpares dos dentes sintomáticos e em 2/13 dentes assintomáticos. Nenhuma endotoxina foi encontrada no grupo controle. A concentração de endotoxinas no tecido pulpar de dentes sintomáticos foi significativamente maior que nos dentes assintomáticos. O estudo sugere que a concentração de endotoxinas no tecido pulpar é

um dos fatores relacionados à dor pulpar, sendo que quanto maior a concentração de endotoxina, maior a reação inflamatória e maior a dor.

**Murakami et al. (2001)** estudaram o envolvimento deste LPS de *Porphyromonas endodontalis* no mecanismo de formação dos abscessos maxilofaciais através da expressão de citocinas inflamatórias. Foi coletado fluido de canais radiculares não infectados (n=16), de canais radiculares com infecção bacteriana (n=56) e pus de abscessos maxilofaciais (n=51). O LPS da *P. endodontalis* foi detectado no fluido dos canais radiculares infectados e no pus de abscessos maxilofaciais de cerca de 90% dos pacientes testados. O teste do ELISA mostrou que níveis significativamente altos de TNF- $\alpha$  estavam presentes no material infectado.

**Chen & Yan (2001)** estudaram o efeito do LPS de *Porphyromonas gingivalis* na reabsorção óssea, por induzir Interleucina (IL-1), fatores de necrose tumoral (TNF) e Prostaglandina E (PGE) a ativarem osteoclastos. Pg-LPS foi preparado pelo método fenol-água. IL1, TNF e PGE induzidos por Pg-LPS foram isolados cromatograficamente. A concentração de íons cálcio foi detectada espectrofotometricamente. O PG-LPS foi capaz de estimular células do tecido periodontal humano a secretar IL-1, TNF e PGE. Estas três citocinas mostraram atividade de acelerar a liberação de cálcio de ossos de ratos, sendo a atividade da PGE a mais forte. Nas membranas periodontais dos ratos injetados de PG-LPS, a quantidade de osteoclastos ativados aumentou de acordo com o tempo de injeção, à medida que também houve um aumento na quantidade de fosfatase ácida e anidrase carbônica, sendo que houve uma associação entre o aumento destas enzimas e a ativação dos osteoclastos.

LPS é um dos principais fatores de virulência da *Prevotella intermedia*, microrganismo associado com o início das doenças pulpares e periodontais. **Pelt et al. (2002)** realizaram um estudo in vitro para examinar os efeitos do LPS da *P. intermedia* na formação óssea e na liberação de mediadores osteolíticos por osteoblastos de feto de rato. LPS da *P. intermedia* foi extraído pelo método água-fenol aquecido. Células do feto de ratas aos 18 meses de gestação foram removidas e incubadas por 20 dias. Após tratamento desta cultura com diferentes concentrações (0.2 – 25µg/ml) de LPS e nitrato por 0, 1, 2, 4 e 11 dias foram calculadas a atividade da fosfatase alcalina (efeitos na diferenciação celular), a concentração de cálcio (mineralização), a produção de óxido nítrico (um importante fator osteolítico) e Interleucina-6 (IL-6). Foi também caracterizada a liberação de matrix de metaloproteinasas por estes osteoblastos. O LPS causou uma diminuição, proporcionalmente à dose aplicada, da atividade da fosfatase alcalina e da incorporação de cálcio na cultura de células do feto de rato, tendo havido 100% de inibição com 25µg/ml de LPS. O tratamento contínuo dos osteoblastos com o LPS causou também um aumento na liberação de óxido nítrico, IL-6 e aumentou significativamente a atividade da matriz de metaloproteínase durante todos os períodos de estimulação. Os resultados indicaram que o LPS da *P. intermedia* não apenas participa da destruição alveolar e reabsorção óssea, como também inibe a formação óssea.

Existem muitas evidências de que material da parede celular de bactérias Gram-positivas tem efeitos na reabsorção óssea e que LPS de bactérias Gram-negativas estimulam diretamente a formação de osteoclastos. **Jiang et al. (2003)** investigaram os mecanismos que levam a destruição dos tecidos periapicais pelos componentes celulares (Lipopolissacarídeos e peptidoglicanos) das bactérias Gram-negativas. Neste estudo, foi examinado o papel dos

peptidioglicanos e o sinergismo dos peptidioglicanos e LPS na formação dos osteoclastos. Análise de PCR foi feita para examinar a presença de receptores nos osteoclastos conhecidamente envolvidos na ativação de mediadores celulares em resposta aos peptidioglicanos e LPS. Na presença de peptidioglicanos houve um estímulo para gerar a formação de células osteoclásticas multinucleadas. Peptidioglicanos e LPS apresentaram um efeito sinérgico na formação de osteoclastos, não só em baixas como em altas concentrações, sendo que nestas houve indução de uma quantidade máxima de formação de osteoclastos. Os resultados evidenciaram a importância de se considerar tanto as bactérias Gram-negativas quanto as Gram-positivas quando se interpreta os achados associados com lesões periapicais primárias e secundárias.

### **3 - PROPOSIÇÃO**

- 1) Estudar a composição da microbiota dos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e alteração periapical de dentes sintomáticos ou assintomáticos.
- 2) Verificar a possível correlação entre a presença de bactérias específicas e sinais e sintomas de origem endodôntica.
- 3) Determinar a suscetibilidade antimicrobiana das bactérias anaeróbias estritas isoladas com maior frequência.
- 4) Quantificar a concentração de endotoxinas e investigar a possível relação com os sinais e sintomas de origem endodôntica.

## **4 - MATERIAL E MÉTODOS**

### **MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES E ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS COM SINAIS E SINTOMAS DE ORIGEM ENDODÔNTICA**

Os métodos usados neste estudo já foram descritos previamente em detalhes (**Gomes, 1995; Gomes *et al.* 1994a,b; 1996a,b; Jacinto *et al.* 2003**).

#### **Isolamento, purificação e identificação das bactérias dos canais radiculares**

##### **Seleção dos pacientes**

Foram selecionados 83 pacientes que procuraram a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP – UNICAMP com necessidade de intervenção endodôntica devido à necrose do tecido pulpar e desenvolvimento de lesão periapical. Os pacientes assinaram um termo de consentimento elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (117/2001). A idade dos pacientes variou entre 10 e 64 anos.

## **Aspectos clínicos**

As seguintes características foram anotadas para cada paciente de forma a serem correlacionadas com os resultados: idade, gênero e tipo de dente. Os sinais e sintomas clínicos anotados incluíam: natureza da dor, história de dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, mobilidade, presença de fístula e sua origem (endodôntica ou periodontal), presença de edema nos tecidos periodontais, edema dos tecidos celulares subcutâneos, profundidade da bolsa periodontal, achados radiográficos e o estado interno do canal (e.g. canal seco ou presença de exsudato claro, purulento ou hemorrágico). Cada tipo de exsudato foi analisado separadamente e também foram agrupados em único grupo denominado `canais molhados`. Pacientes com resposta negativa a todos os sintomas foram considerados assintomáticos. Pacientes com resposta positiva a um ou mais dos seguintes sintomas foram considerados sintomáticos: dor espontânea, dor à palpação, dor à percussão e presença de edema.

## **Coleta de amostras**

Noventa canais radiculares foram investigados microbiologicamente, dos 83 pacientes selecionados.

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

1. Técnicas assépticas foram usadas durante toda a terapia endodôntica e coleta de amostra.

2. Remoção dos contaminantes coronários
3. Eliminação das vias de contaminação externa.
4. Isolamento absoluto do dente.
5. Descontaminação do campo operatório.
6. Assegurar um acesso fácil ao instrumento de amostra.
7. Evitar contaminação química do espaço pulpar.
8. Coleta das amostras de forma padronizada.

Inicialmente, o dente envolvido recebeu polimento coronário com pedra-pomes e foi isolado com lençol de borracha. A seguir, foi feito o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder, Locite, São Paulo, SP) para evitar a infiltração com saliva. Procedeu-se então a primeira descontaminação da superfície do dente, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato, usando swabs estéreis umedecidos primeiramente em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (v/v) e depois em NaOCl 2,5% por 30 s cada, sendo subsequentemente neutralizados com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5% (Möller, 1966). Após a abertura coronária, o campo operatório e a câmara pulpar foram descontaminados novamente, com as mesmas soluções, e neutralizados. Em cada caso foi coletada amostra de um único canal radicular, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico. Em caso de dentes multirradiculares escolheu-se o canal mais amplo ou aquele que apresentava maior lesão periapical ou maior exsudação.

Para a coleta da amostra microbiológica dos canais radiculares cones de papel absorvente autoclavados foram introduzidos no comprimento total do canal (determinado

pela radiografia pré-operatória), permanecendo nesta posição por 60 segundos. Casos em que o canal apresentava-se seco, 10 µl de solução salina estéril eram introduzidos no canal para assegurar uma cultura viável. Foram utilizados de 3 a 5 cones por canal de acordo com a quantidade de exsudato encontrado.

Os cones de papel absorvente, ao serem retirados do canal, foram imediatamente introduzidos em micro tubos plásticos (tipo Eppendorf) contendo 1,0 mL de meio de transporte RTF – (“Reduced Transport Fluid”), o qual era transportado para o laboratório de Microbiologia Endodôntica. A manipulação das amostras dos canais radiculares foi realizada sob fluxo contínuo de nitrogênio (**Berg & Nord, 1973**). O tempo máximo entre a realização da coleta e o seu processamento laboratorial foi de 4 horas

### **Inoculação e Incubação**

No laboratório de microbiologia, dentro da cabine de anaerobiose (DON WHITLEY SCIENTIFIC, Bradford, Inglaterra), os tubos tipo eppendorf, contendo RTF e o cone de papel absorvente, foram colocados no Agitador (MA 162-MARCONI, São Paulo, SP Brasil) por 60 segundos para facilitar a dispersão dos microrganismos. 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, UK) e foram inoculados 50µL de cada diluição em placas pré-reduzidas contendo “Fastidious Anaerobe Ágar” (FAA - Lab M, Bury, UK) + 5% de sangue de carneiro e FAA + 5% de sangue de carneiro + suplementos seletivos para anaeróbios, as quais foram incubadas em uma câmara de anaerobiose, a 37°C, numa atmosfera de 10% H<sub>2</sub>,

10% CO<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub> até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento lento. Foram também inoculados 50 µL em uma placa de Brain Heart Infusion (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) ágar sangue, a qual foi incubada aerobicamente a 37°C por 2 dias, para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos.

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

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA (Fastidious Anaerobe Ágar), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para permitir o crescimento de anaeróbios estritos e facultativos.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL [ácido nalidíxico, 0,001% (peso/volume)], 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-positivos a actinomicetos.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NAL + VAN (vancomicina, 0,5 mg/l), 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-negativos.
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + VAN + KAN [kanamicina, 0,0075% (peso/volume)], 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar anaeróbios Gram-negativos (particularmente os "bacilos formadores de pigmento preto")
- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + FAA + NEO [neomicina, 0,0075% (peso/volume)], 37° C, anaerobicamente, por 2, 5 e 14 dias, para selecionar clostrídios e outros anaeróbios.

- Placas de ágar contendo 5% de sangue de carneiro + Brain Heart Infusion (BHI) ágar (Oxoid, Basingstoke, UK), aerobicamente a 37° C, por 1 dia, para permitir o crescimento de organismos aeróbios ou facultativos.

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. O meio de transporte foi preparado de acordo com a fórmula original (Syed & Loesche, 1972).

### **Isolamento e identificação microbiana**

Após a incubação, cada placa era examinada em lupa estereoscópica (Lambda Let 2, Atto instruments CO, Hong Kong) em aumento de 3 vezes, para que as colônias pudessem ser diferenciadas de acordo com as suas características macroscópicas na placa, 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-se uma placa na estufa de O<sub>2</sub> e outra na câmara de anaerobiose, e observando em qual condição gasosa houve crescimento bacteriano. As espécies que cresceram somente em incubação anaeróbia foram a seguir incubadas em estufa de CO<sub>2</sub>, e se não havia nenhum crescimento, estes eram consideradas anaeróbios estritos. Em seguida, as culturas puras foram inicialmente identificadas de acordo com a morfologia da coloração de Gram e testadas quanto à produção de catalase.

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

Testes adicionais foram utilizados para confirmação da identificação de bactérias do gênero *Prevotella/Porphyromonas*:

- a) Fluorescência das colônias sob luz UV 360nm de comprimento de onda (no caso de fluorescência negativa, a confirmação foi realizada através da utilização de metanol (Merck));

- b) Fermentação de lactose utilizando o substrato 4-metilumbeliferil-b-D-galactosidase (MUG) –Sigma conforme a técnica descrita por **Alcoforado et al. (1987)**.
- c) Atividade da tripsina utilizando o composto sintético fluorogênico L-arginina7-amino-4-metilcoumarina amido-HCl (CAAM) – Sigma aplicando-se a técnica de **Slots (1987)**.

Para aplicação desses testes de identificação rápida de BPPN, alíquotas de 20 µl das soluções de MUG e CAAM foram dispensadas nas placas, sobre as colônias com morfologia característica para a identificação de *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *P. melaninogenica*, *P. corporis*, *P. denticola*, *P. loescheii*.

Todas as amostras foram congeladas a – 70°C imediatamente após a diluição, com o objetivo de serem usadas em pesquisas futuras.

### **Análise estatística**

Os dados coletados foram digitados numa planilha de cálculo (QUATTRO PRO, Bordland International Inc., Scotts Valley, CA, USA) e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). O teste de  $X^2$  de Pearson, ou o teste exato de Fisher quando apropriados, foram escolhidos para testar a hipótese nula de que não existe, por exemplo, nenhuma relação entre sinais e sintomas de origem endodônticas e a presença de determinadas bactérias, com nível de significância de 5%.

## TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

### E-Test

O sistema do E-test consiste em uma fita plástica de 50 mm de comprimento e 3mm de largura que contém, de 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 (concentração inibitória mínima) que varia de 0,016 a 256 µg/ mL, com um total de 29 diferentes CIMs, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição.

Para preparar o inóculo, após 24-48 h de incubação da espécie bacteriana em placas de ágar sangue, as colônias bacterianas anaeróbias estritas foram transferidas para o meio líquido “Fastidious Anaerobe Broth” (FAB) e agitadas, para atingir a turgidez que equivale ao padrão 1 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil), ou seja,  $3 \times 10^8$  CFU para bactérias anaeróbias estritas, o qual foi verificado no espectrofotômetro (MARCONI, São Paulo, SP, Brasil).

Placas contendo 4 mm de espessura de Brucella Ágar (OXOID, Hampshire, Inglaterra) + 5% de sangue de carneiro desfibrinado, 1% de vitamina K + 0,5% de hemina (para bactérias anaeróbias estritas) foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, uniformemente, através de swab estéril, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (10 a 15 minutos), as fitas de E-test, que haviam sido previamente removidas do congelador e já se encontravam em temperatura

ambiente por cerca de 20 minutos, foram distribuídas em cada placa com o auxílio de pinça estéril.

As placas contendo as bactérias anaeróbias estritas foram imediatamente incubadas em uma câmara de anaerobiose a 37°C, numa atmosfera de 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub>, e a leitura realizada após 24 ou 48 h de incubação. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados pela leitura do ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test.

De acordo com as recomendações do fabricante, a interpretação dos valores das CIMs do E-test em diferentes categorias de sensibilidade foi realizada seguindo o guia de interpretação da NCCLS como segue: para amoxicilina  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ , para amoxicilina + ácido clavulânico  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ , para clindamicina  $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ , para metronidazol  $\leq 8 \mu\text{g/mL}$ , para benzilpenicilina  $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$  e para cefaclor (cefalosporina)  $\leq 16 \mu\text{g/mL}$ . As concentrações inibitórias mínimas para azitromicina e eritromicina contra anaeróbios estritos ainda não foram determinadas pela NCCLS. A CIM para eritromicina, neste estudo, foi considerada  $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ , de acordo com trabalho de **Kuriyama *et al.* (2000)**.

Para cálculo das CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de cada antibiótico, os valores obtidos no teste de cada cepa foram dispostos em ordem crescente. A concentração suficiente para inibir o crescimento de 50% das cepas foi considerada a CIM<sub>50</sub> e a concentração necessária para inibir o crescimento de 90% das cepas foi considerada a CIM<sub>90</sub>.

# **QUANTIFICAÇÃO DAS ENDOTOXINAS PRESENTES EM CANAIS RADICULARES INFECTADOS**

## **Seleção dos pacientes**

Para a realização dos testes de quantificação de endotoxinas foram selecionados outros 50 pacientes que procuraram a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – FOP – UNICAMP com necessidade de intervenção endodôntica devido à necrose do tecido pulpar e desenvolvimento de lesão periapical. Uma história médica e dentária detalhada foi obtida de cada paciente. Pacientes que tinham recebido tratamento antibiótico nos últimos 3 meses ou portadores de doenças sistêmicas foram excluídos do estudo. Os pacientes assinaram um termo de consentimento elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

## **Aspectos clínicos**

As seguintes características foram anotadas para cada paciente de forma a serem correlacionadas com os resultados: idade, gênero e tipo de dente. Os sinais e sintomas clínicos anotados incluíam: natureza da dor, história de dor prévia, dor a percussão, dor a palpação, mobilidade, presença de fístula e sua origem (endodôntica ou periodontal), presença de edema nos tecidos periodontais, profundidade da bolsa periodontal, achados radiográficos e o estado interno do canal (e.g. canal seco ou presença de exsudato claro, purulento ou hemorrágico). Cada tipo de exsudato foi analisado separadamente e também

agrupados em único grupo denominado `canais molhados`. Pacientes com resposta negativa a todos os sintomas foram considerados assintomáticos. Pacientes com resposta positiva a um ou mais dos seguintes sintomas foram considerados sintomáticos: dor espontânea, dor à palpação, dor à percussão, edema e exsudato purulento.

### **Coleta de amostras**

Inicialmente, o dente envolvido recebeu polimento coronário com pedra-pomes e foi isolado com lençol de borracha. A seguir, foi feito o vedamento da interface coroa/lençol com cianocrilato (Super Bonder, Locite, São Paulo, SP, Brasil) para evitar a infiltração com saliva. Procedeu-se então a primeira descontaminação da superfície do dente, grampo, lençol de borracha, arco e cianocrilato, usando swabs estéreis umedecidos primeiramente em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (v/v) e depois em NaOCl 2,5% por 30 s cada, sendo subsequentemente neutralizados com solução estéril de tiosulfato de sódio a 5% (Möller, 1966). Após a abertura coronária, o campo operatório e a câmara pulpar eram descontaminados novamente, com as mesmas soluções, e neutralizados.

Para a coleta, cones de papel absorvente estéreis e apirogênicos (Dentsply, Petrópolis, RJ) foram introduzidos no comprimento total do canal (determinado pela radiografia pré-operatória), permanecendo nesta posição por 60 segundos. Casos em que o canal apresentava-se seco, 10 µl de solução salina estéril e apirogênica foram introduzidos no canal para assegurar uma cultura viável. Foram utilizados 5 cones por canal.

Os cones de papel absorvente, ao serem retirados do canal, foram imediatamente introduzido em tubos de vidro contendo 1.0 mL de soro fisiológico estéril e apirogênico, os quais foram transportados para o laboratório de Microbiologia Endodôntica.

### **Inoculação e Incubação**

No laboratório de microbiologia, dentro da câmara de fluxo laminar (Pachane, Piracicaba, SP, Brasil) os tubos de vidro contendo as amostras, foram colocados no 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, UK) e foram inoculados 50µL de cada diluição em placas pré-reduzidas contendo “Fastidious Anaerobe Ágar” (FAA - Lab M, Bury, UK) + 5% de sangue de carneiro e FAA + 5% de sangue de carneiro + suplementos seletivos para anaeróbios as quais foram incubadas em uma câmara de anaerobiose a 37°C, numa atmosfera de 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub> até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento lento. Após este período foi realizada a contagem de unidades formadoras de colônia e foi verificado o crescimento de bacilos produtores de pigmento negro. Imediatamente após a diluição, os vidros contendo a amostra foram congelados a -20°C até o momento da realização dos testes para quantificação de endotoxinas.

## **Quantitative Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (QCL-1000 - LAL)**

Materiais fornecidos com o KIT:

1) Água apirogênica: foram fornecidos 2 vidros contendo 30 ml de água apirogênica cada, os quais foram usados para reconstituição de todos os reagentes e como controle negativo (branco).

2) Endotoxina de *E. coli*: um vidro contendo aproximadamente 15-30 EU de endotoxina liofilizada. A reconstituição foi feita pela adição de 1,0 ml da água apirogênica a temperatura ambiente. A atual concentração do vidro foi determinada pelo valor estabelecido no certificado de qualidade. Deve-se realizar agitação rigorosa em vórtex por 15 minutos. Esta solução pode ser armazenada por 1 mês a 2-8°C. Previamente ao uso, a solução deve ser levada a temperatura ambiente e vigorosamente agitada por 15 minutos.

3) Substrato cromogênico: A reconstituição foi feita pela adição de 6,5 ml da água apirogênica para atingir uma concentração aproximada de 2mM, sendo utilizados dois vidros contendo aproximadamente 7mg de substrato liofilizado.

4) Lisado de amebócito de Limulus (LAL): 5 vidros contendo o lisado liofilizado preparado dos amebócitos circulantes no sangue do *Limulus polyphemus*. Deve ser reconstituído imediatamente antes do uso com 1,4 ml de água apirogênica.

## **PROCEDIMENTOS**

Durante os procedimentos uma série de precauções foi tomada para evitar a contaminação da amostra. Todos os materiais que entraram em contato com a amostra eram apirogênicos (livres de endotoxinas). Técnicas cuidadosas foram usadas para evitar a contaminação microbiana ou por endotoxinas. Adesão irrestrita aos tempos e temperaturas especificadas no manual de instruções do fabricante foi mantida durante todo o procedimento.

### **Preparo preliminar dos reagentes**

Para cada série de testes, 4 soluções de endotoxina padrão foram utilizadas. O quadro 1 mostra o esquema de diluição para a construção da curva padrão (Figura 1). A curva padrão foi usada como parâmetro para o cálculo da concentração de endotoxinas nas amostras usando a endotoxina fornecida no kit (*Escherichia coli* O111:B4) com uma concentração conhecida ( $X = 23$  Unidades de endotoxinas (EU.ml<sup>-1</sup>)). Esta foi preparada utilizando soluções com concentrações 1,0 EU/ml, 0,5 EU/ml, 0,25 EU/ml e 0,1 EU/ml como descrito no quadro abaixo:

Tubo	Concentração de Endotoxina (EU/ml)	Solução estoque De endotoxina	Solução padrão de Endotoxina 1 EU/ml	Água apirogênica
1	1,0	0,1 ml		(X-1)/10ml
2	0,5		0,5 ml	0,5 ml
3	0,25		0,5 ml	1,5 ml
4	0,1		0,1 ml	0,9 ml

**Quadro 1-** Diluição da endotoxina de *E. coli* para a construção da curva padrão.

Tubo 1: para preparar a solução de endotoxina padrão na concentração 1,0 EU/ml foi utilizado 0,1 ml da solução estoque de endotoxina de *E. coli* em 2,4 ml de LAL água reagente [(X-1)/10ml], onde X = 23 EU/ml. A solução foi vigorosamente agitada por 60 segundos.

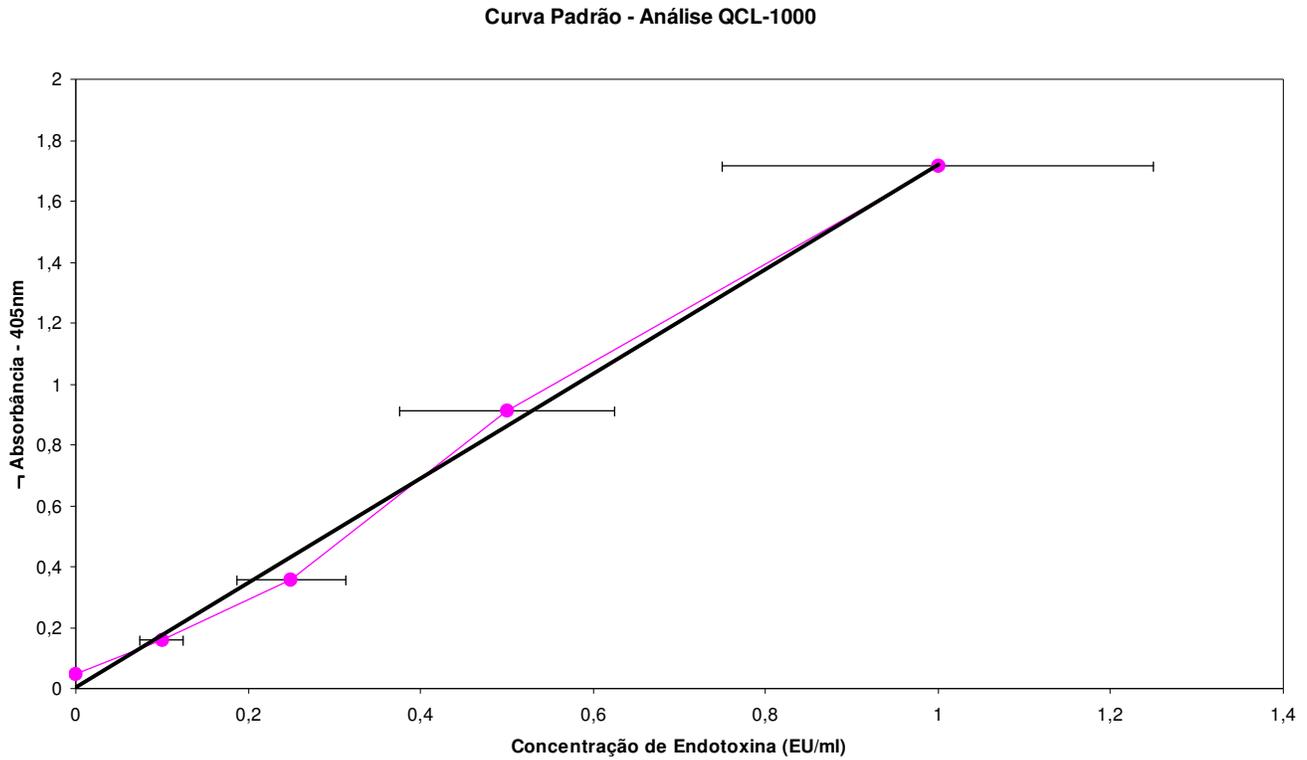
Tubo 2: 0,5 ml da solução do tubo 1 (1,0 EU/ml) foi colocada em 0,5 ml de LAL água reagente, resultando em uma concentração de 0,5 ml EU/ml.

Tubo 3: 0,5 ml da solução do tubo 1 (1,0 EU/ml) foi colocada em 1,5 ml de LAL água reagente, resultando em uma concentração 0,25 EU/ml.

Tubo 4: 0,1 ml da solução do tubo 1 (1,0 EU/ml) foi colocada em 0,9 ml de LAL água reagente, resultando em uma concentração de 0,1 EU/ml.

Os valores da absorbância das soluções de endotoxina previamente preparadas foram espectrofotometricamente medidos a 405 nm no leitor de ELISA. A absorbância a 405 nm foi linear com os intervalos de concentração usados. A linearidade da curva padrão dentro do

intervalo de concentração foi usada para determinar os valores de endotoxina. A reprodutibilidade pode ser verificada pela comparação das diferentes curvas.



**Figura 1.** Curva padrão utilizada como parâmetro para o cálculo das concentrações de endotoxina das amostras, com base na endotoxina da *Escherichia coli* O111:B4 com uma concentração conhecida de 23 Unidades de endotoxinas (EU.ml-1)

## **Teste**

Diluições seriadas das amostras foram feitas até  $10^{-4}$ . Água do reagente LAL (branco) foi usada como controle negativo. Todas as reações foram realizadas em duplicata para validar o teste. Uma microplaca de 96 “wells” (Corning Costar Corporation, Cambridge, MA, USA) foi usada em bloco de aquecimento a 37 °C, onde foi mantida durante todo o procedimento. Inicialmente, 50 µL do branco foi adicionado à placa, seguido da endotoxina padrão e das amostras consecutivamente adicionadas em cada well. Este passo foi seguido pela adição de 50 µL do LAL em cada well usando uma pipeta multi-canal, então, a microplaca contendo o branco, endotoxina padrão e as amostras, mais o LAL foi brevemente agitada. Dez minutos depois 100 µL da solução de substrato (pré-aquecida a 37 °C) foi adicionada a cada well, mantendo sempre a mesma seqüência. A placa foi agitada e incubada a 37 °C por 6 minutos, depois dos quais 100 µL do ‘stop reagent’ (ácido acético, 25% v/v) foi adicionado em cada well. A absorbância (405 nm) foi lida usando espectrofotômetro (Ultrask, Bio-Rad, Foster City, CA, USA).

## **Cálculo da concentração de endotoxina**

Os valores médios de absorbância do branco foram subtraídos dos padrões e dos valores das amostras para calcular a média de absorbância das amostras. Como este valor de absorbância é diretamente proporcional a concentração de endotoxina presente, a concentração de endotoxina foi determinada com base na curva padrão.

### *Análise estatística*

Os dados coletados foram analisados estatisticamente usando Intercooled Stata 8.2 for Windows, (Copyright 1985-2003, StataCorp, College Station, Texas, USA.). O teste de Pearson Chi-quadrado ou o teste exato one-sided Fisher, quando apropriado, foram escolhidos para testar a hipótese nula de que não há relação entre a concentração de endotoxinas presente no canal radicular e os sinais e sintomas endodônticos. Adicionalmente, gráficos de regressão foram criados para sinais e sintomas contra o número de UFCs ou a concentração de endotoxinas, nível de significância 5%.

## **5 - RESULTADOS**

### **MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES E ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS COM SINAIS E SINTOMAS DE ORIGEM ENDODÔNTICA**

Foram examinados 90 canais radiculares, sendo 37 incisivos superiores, 5 caninos superiores, 9 pré-molares superiores, 4 molares superiores, 12 incisivos inferiores, 15 pré-molares inferiores e 8 molares inferiores. A idade dos pacientes variou de 10 a 64 anos, com média de 31,8 anos. Sessenta dentes pertenciam a pacientes do sexo feminino e 30 a pacientes do sexo masculino. Vinte e três dentes não apresentavam qualquer tipo de sintomatologia no momento da coleta. Cinquenta e quatro pertenciam a pacientes que estavam com dor espontânea no momento da coleta. Cinquenta e oito dentes apresentavam dor à percussão. Quarenta e três apresentavam dor à palpação da região periapical, sendo que 33 apresentavam esta região edemaciada. Todos os dentes apresentavam o tecido pulpar necrosado e, ainda, nenhum deles havia recebido qualquer tipo de tratamento endodôntico prévio. As coroas dentais de 8 elementos estavam híginas, 37 apresentavam restauração definitiva (apenas quatro em boas condições), 6 apresentavam restaurações provisórias. Os outros 39 dentes apresentavam a coroa dental destruída, a maioria por cárie. Com relação à região periapical, foram selecionados dentes que apresentavam lesão radiolúcida visível radiograficamente. Apenas três dentes não apresentavam lesão visível radiograficamente, porém apresentavam espessamento do ligamento periodontal e estavam relacionados com casos de sintomatologia aguda. Com relação à condição interna dos canais, 50 estavam secos

e 40 apresentavam exsudação, na maioria deles o exsudato era purulento. A presença de fístula pode ser observada clinicamente na região próxima ao periápice de 12 dentes.

Bactérias cultiváveis foram isoladas em 98,8% dos canais radiculares, sendo que apenas um canal radicular não apresentou cultura positiva. Este canal onde não foi encontrado nenhum microrganismo pertencia a um paciente que não estava com dor no momento da coleta, não havia relato de dor prévia, não pode ser observado nenhum tipo de sintomatologia, a coroa estava hígida, a região periapical apresentava uma lesão visível radiograficamente e havia relato de trauma neste elemento. Canais radiculares abrigaram individualmente um máximo de 9 espécies, com média de 4-5 espécies por canal (Figura 2). Foram encontradas 400 bactérias cultiváveis, que pertenciam a 69 diferentes espécies e 22 diferentes gêneros, sendo que 28 microrganismos tiveram a identificação apenas pelo gênero. (Tabela 1).

Anaeróbios estritos corresponderam à cerca de 80 % do total de espécies isoladas (Figura 3) e estavam presentes em 85 dos 90 canais estudados. Os microrganismos anaeróbios encontrados em maior frequência foram: *Fusobacterium nucleatum* (n=35), *Prevotella intermedia* (n=21), *Anaerococcus prevottii* (n=19), *Prevotella oralis* (n=19), *Peptostreptococcus micros* (n=18), *Fusobacterium necrophorum* (n=16), *Veillonella* spp. (n=16), *Eggertella lenta* (n=12), *Porphyromonas gingivalis* (n=11) (Tabela 1).

Houve significância estatística entre anaeróbios estritos, dor espontânea e dor à percussão (ambos  $p < 0,01$ ). Bactérias Gram-negativas corresponderam a 42,25% (169/400) do total de microrganismos isolados (Figura 3) e foram associadas à dor, dor prévia, dor à palpação e edema (todos  $p < 0,05$ ).

BPPN foram encontrados em 44,4% dos canais radiculares, sendo que 75% deles foram isolados de canais radiculares de dentes de pacientes com dor espontânea e 20% estavam presentes em canais de pacientes sem dor no momento da coleta, mas com dor prévia. As espécies de BPPN encontradas foram *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Prevotella corporis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella loescheii*, *Prevotella denticola* e *Prevotella melaninogenica* (Tabela 1).

Associações foram encontradas entre dor (n=54) e bactérias produtoras de pigmento negro, além das seguintes espécies bacterianas: *Prevotella* spp. ( $p < 0,01$ ), *Prevotella intermedia*, *Prevotella oralis* (ambos  $p < 0,05$ ), *Prevotella buccae* ( $p < 0,01$ ), e *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp, *Bifidobacterium* spp., *Propionibacterium propionicum* (todos  $p < 0,05$ ).

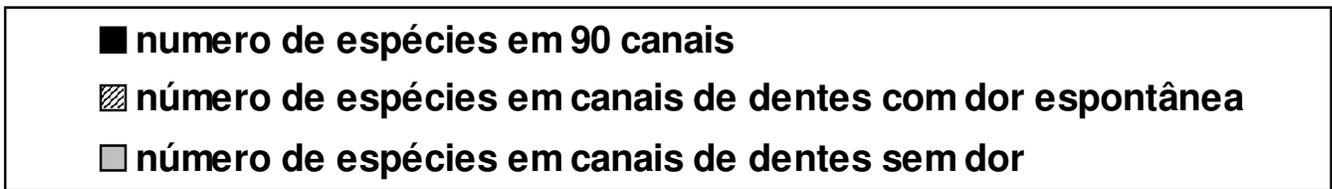
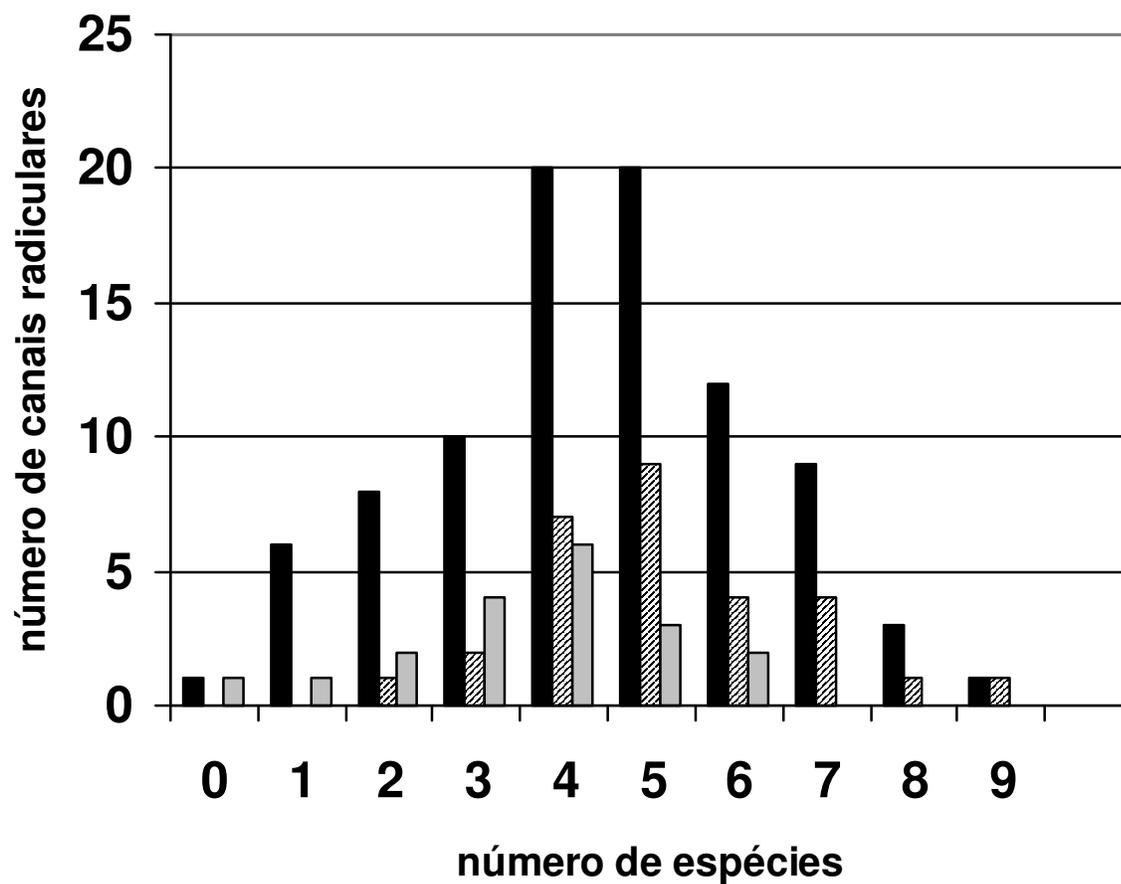
Dor prévia, relatada por 44 pacientes, foi associada a *Bifidobacterium* spp., *Prevotella loescheii* e *Peptostreptococcus* spp. ( $p < 0,05$ ).

Dor à percussão (n=58) foi relacionada a *Bifidobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium propionicum* e *Streptococcus constellatus* (todos  $p<0,05$ ).

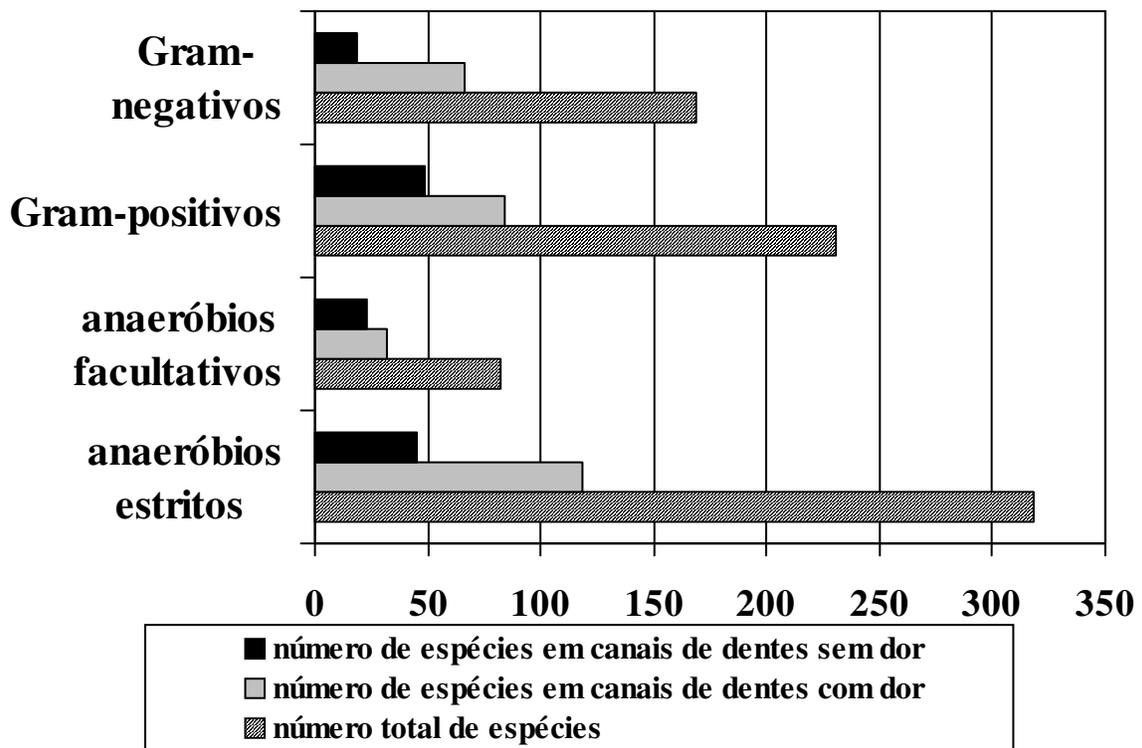
Relação estatisticamente significativa foi encontrada entre dor à palpação (n=43) e as seguintes bactérias: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Propionibacterium* spp., e *Streptococcus anginosus* (todos  $p<0,05$ ).

Edema (n=20) foi estatisticamente associado ao *Fusobacterium* spp. especialmente *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus* spp., especialmente *Peptostreptococcus prevotti* (todos  $p<0,05$ ) e *Streptococcus anginosus* ( $p<0,01$ ).

Presença de exsudato no canal radicular foi associada a Bactérias produtoras de pigmento negro, especialmente *Prevotella intermedia* ( $p<0,01$ ), *Actinomyces meyeri*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus anginosus* (todos  $p<0,05$ ). Exsudato purulento foi associado à presença de *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus* spp., *Streptococcus* spp. (todos  $p<0,05$ ) e *Streptococcus anginosus* ( $p<0,01$ ). Exsudato claro e hemorrágico não foram associados a nenhuma bactéria, apesar dos canais apresentarem crescimento bacteriano.



**Figura 2** - Distribuição de bactérias por canal radicular



**Figura 3** - Frequência de anaeróbios estritos, anaeróbios facultativos, Gram-positivos e Gram-negativos em canais de dentes com dor espontânea e sem dor no momento da coleta.

**Tabela 1:** Frequência, morfologia e coloração de Gram dos microrganismos isolados de 90 canais radiculares.

<b>Espécie</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Gram</b>	<b>Requerimento gasoso</b>	<b>Total</b>
<i>F. nucleatum</i>	bacilo	negativo	anaeróbio	N=35
<i>G. morbillorum</i>	coco	positivo	facultativo	N=22
<i>P. intermedia</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=21
<i>A. prevotii</i>	coco	positivo	anaeróbio	N=19
<i>P. oralis</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=19
<i>P. micros</i>	coco	positivo	anaeróbio	N=18
<i>F. necrophorum</i>	bacilo	negativo	anaeróbio	N=16
<i>Veillonella</i> spp.	coco	negativo	anaeróbio	N=16
<i>E. lenta</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=12
<i>P. gingivalis</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=11
<i>S. sanguis</i>	coco	positivo	facultativo	N=11
<i>S. constellatus</i>	coco	positivo	anaeróbio	N=10
<i>A. odontolyticus</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=9
<i>Clostridium</i> spp	bacilo	positivo	anaeróbio	N=9
<i>B. adolescentis</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=9
<i>P. buccae</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=9
<i>P. propionicum</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=8
<i>Bifidobacterium</i> spp	bacilo	positivo	anaeróbio	N=8
<i>A. meyeri</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=7
<i>E. limosum</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=7
<i>S. mitis</i>	coco	positivo	facultativo	N=7
<i>P. loescheii</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=6
<i>P. corporis</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=6
<i>P. acnes</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=6
<i>L. acidophilus</i>	bacilo	positivo	facultativo	N=6
<i>B. gracilis</i>	bacilo	negativo	anaeróbio	N=5
<i>B. fragilis</i>	bacilo	negativo	anaeróbio	N=5
<i>P. anaerobius</i>	coco	positivo	anaeróbio	N=5
<i>A. viscosus</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=5
<i>S. oralis</i>	coco	positivo	facultativo	N=4
<i>S. anginosus</i>	coco	positivo	facultativo	N=4
<i>E. faecalis</i>	coco	positivo	facultativo	N=4
<i>S. epidermidis</i>	coco	positivo	facultativo	N=4
<i>P. denticola</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=3
<i>P. melaninogenica</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=3
<i>B. ureolyticus</i>	bacilo	negativo	anaeróbio	N=3

**Tabela 1:** Frequência, morfologia e coloração de Gram dos microrganismos isolados de 90 canais radiculares (continuação)

<b>Espécie</b>	<b>Morfologia</b>	<b>Gram</b>	<b>Requerimento gasoso</b>	<b>Total</b>
<i>T. praecuta</i>	bacilo	negativo	anaeróbio	N=3
<i>C. butyricum</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=3
<i>Haemophylus</i> spp.	bacilo	negativo	facultativo	N=3
<i>Staphylococcus</i> spp	coco	positivo	facultativo	N=3
<i>Streptococcus</i> spp.	coco	positivo	facultativo	N=2
<i>P. asaccharolyticus</i>	coco	positivo	anaeróbio	N=2
<i>S. saccharolyticus</i>	coco	positivo	facultativo	N=2
<i>Neisseria</i> spp.	coco	negativo	facultativo	N=2
<i>C. sporogens</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=2
<i>C. hastiforme</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=2
<i>C. botulinum</i>	bacilo	positivo	anaeróbio	N=2
<i>P. granulosum</i>	bacilo	positivo	anaerobio	N=2
<i>P. endodontalis</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=1
<i>P. bivia</i>	cocobacilo	negativo	anaeróbio	N=1
<i>P. magnus</i>	coco	positivo	anaeróbio	N=1
<i>F. varium</i>	bacilo	negativo	anaeróbio	N=1
<i>B. breve</i>	bacilo	positivo	anaerobio	N=1
<i>A. naeslundii</i>	bacilo	positivo	facultativo	N=1
<i>A. israelii</i>	bacilo	positivo	anaerobio	N=1
<i>E. faecium</i>	coco	positivo	facultativo	N=1
<i>S. aureus</i>	coco	positivo	facultativo	N=1
<i>S. lentus</i>	coco	positivo	facultativo	N=1
<i>G. haemolysans</i>	coco	positivo	facultativo	N=1
<i>Aer. viridans</i>	coco	positivo	anaeróbio	N=1
<i>C. difficile</i>	bacilo	positivo	anaerobio	N=1
<i>C. acetobutyricum</i>	bacilo	positivo	anaerobio	N=1
<i>Micrococcus</i> spp.	coco	positivo	facultativo	N=1
<i>H. haemolyticus</i>	bacilo	negativo	facultativo	N=1
<i>Eubacterium</i> spp.	bacilo	positivo	anaerobio	N=1
<i>Capnocytophaga</i> spp	coco	negativo	anaeróbio	N=1
<i>Peptostreptoc</i> spp.	coco	positivo	anaeróbio	N=1
<i>Actinomyces</i> spp	bacilo	positivo	Anaeróbio	N=1

## TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Os resultados dos testes de suscetibilidade antimicrobiana contra *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Prevotella oralis*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium necrophorum*, *Peptostreptococcus prevottii* e *Porphyromonas gingivalis* podem ser observados nas Tabelas 2-8, respectivamente.

Embora os resultados do E-test, após 24 horas de incubação, tenham sido considerados legíveis ou interpretáveis para 80% das cepas de *Fusobacterium necrophorum* e para 20% dos BPPN, após 48 horas os resultados estavam legíveis para 90% das cepas testadas.

Os valores das CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> se referem às concentrações inibitórias mínimas que são efetivas contra 50% e 90% das cepas testadas.

As Tabelas 2-8 também mostram o intervalo de CIM para cada antibiótico contra as cepas testadas, bem como o índice de suscetibilidade das cepas contra cada antibiótico, de acordo com as concentrações inibitórias mínimas previamente determinadas pela NCCLS. A CIM para azitromicina contra anaeróbios estritos ainda não foi estabelecida pela NCCLS, tendo sido impossível analisar o índice de suscetibilidade das cepas contra este antibiótico.

**Tabela 2** - Suscetibilidade antimicrobiana dos *Fusobacterium nucleatum* contra 8 antibióticos.

<i>Fusobacterium nucleatum</i> (n=30)					
Antibióticos	CIM (µg/mL)*		Intervalo de CIM	Valores de CIM da NCCLS	Índice de suscetibilidade (%)
	50%	90%			
Penicilina G	0,016	0,064	0,016 – 1,0	≤ 0.5µg/mL	96,7%
Amoxicilina + ác. clavulânico	0,016	0,125	0,016 – 1,5	≤ 2µg/mL	100%
Amoxicilina	0,023	0,25	0,016 – 1,5	≤ 4 µg/mL	100%
Clindamicina	0,016	0,5	0,016 – 8,0	≤ 2µg/mL	96,7%
Metronidazol	0,016	0,75	0,016 – 0,25	≤ 8µg/mL	100%
Eritromicina	0,094	4,0	0,016 – 32,0	≤ 4µg/mL	70%
Cefaclor	0,032	0,38	0,016 – 1,5	≤ 16µg/mL.	100%
Azitromicina+	0,016	4,0	0,016 – 16,0	-	-

\* CIM50% e CIM90% correspondem à concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

+ O CIM da azitromicina para os anaeróbios estritos ainda não foi estabelecido pelo NCCLS

**Tabela 3** - Suscetibilidade antimicrobiana das cepas *Prevotella intermedia/nigrescens* contra 8 antibióticos.

<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i> (n=17)					
Antibióticos	CIM (µg/mL)*		Intervalo de CIM	Valores de CIM da NCCLS	Índice de suscetibilidade (%)
	50%	90%			
Penicilina G	0,064	1,5	0,016 – 3,0	≤ 0.5µg/mL	88,2%
Amoxicilina + ác. clavulânico	0,016	0,25	0,016 – 0,75	≤ 2µg/mL	100%
Amoxicilina	0,032	1,5	0,016 – 3,0	≤ 4 µg/mL	100%
Clindamicina	0,016	0,38	0,016 – 4,0	≤ 2µg/mL	94,1%
Metronidazol	0,016	4,0	0,016 – 16,0	≤ 8µg/mL	82,3%
Eritromicina	0,023	1,0	0,016 – 1,5	≤ 4µg/mL	100%
Cefaclor	0,047	1,0	0,016 – 2,0	≤ 16µg/mL.	100%
Azitromicina+	0,032	0,38	0,016 – 12,0	-	-

\* CIM50% e CIM90% correspondem à concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

+ O CIM da azitromicina para os anaeróbios estritos ainda não foi estabelecido pelo NCCLS

**Tabela 4** - Suscetibilidade antimicrobiana das *Prevotella oralis* contra 8 antibióticos.

<i>Prevotella oralis</i> (n=16)					
Antibióticos	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )*		Intervalo de CIM	Valores de CIM da NCCLS	Índice de suscetibilidade (%)
	50%	90%			
Penicilina G	0,032	0,125	0,016 – 0,125	$\leq 0.5\mu\text{g/mL}$	100%
Amoxicilina + ác. clavulânico	0,016	0,25	0,016 – 0,75	$\leq 2\mu\text{g/mL}$	100%
Amoxicilina	0,032	2,0	0,016 – 0,75	$\leq 4\mu\text{g/mL}$	100%
Clindamicina	0,016	0,38	0,016 – 0,38	$\leq 2\mu\text{g/mL}$	100%
Metronidazol	0,094	1,0	0,016 – 1,5	$\leq 8\mu\text{g/mL}$	100%
Eritromicina	0,032	16,0	0,016 – 64,0	$\leq 4\mu\text{g/mL}$	87,5%
Cefaclor	0,094	1,0	0,016 – 2,0	$\leq 16\mu\text{g/mL}$	100%
Azitromicina+	0,19	12,0	0,016 – 12,0	-	-

\* CIM50% e CIM90% correspondem à concentração inibitória mínima para necessária para inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

+ O CIM da azitromicina para os anaeróbios estritos ainda não foi estabelecido pelo NCCLS

**Tabela 5** - Suscetibilidade antimicrobiana dos *Peptostreptococcus micros* contra 8 antibióticos.

<i>Peptostreptococcus micros</i> (n=16)					
Antibióticos	CIM (µg/mL)*		Intervalo de CIM	Valores de CIM da NCCLS	Índice de suscetibilidade (%)
	50%	90%			
Penicilina G	0,023	0,125	0,016 – 0,38	≤ 0.5µg/mL	100%
Amoxicilina + ác. clavulânico	0,016	0,094	0,016 – 0,19	≤ 2µg/mL	100%
Amoxicilina	0,016	0,032	0,016 – 0,064	≤ 4 µg/mL	100%
Clindamicina	0,094	1,0	0,016 – 1,5	≤ 2µg/mL	100%
Metronidazol	0,25	2,0	0,016 – 3,0	≤ 8µg/mL	100%
Eritromicina	0,094	1,5	0,016 – 2,0	≤ 4µg/mL	100%
Cefaclor	0,25	2,0	0,016 – 4,0	≤ 16µg/mL.	100%
Azitromicina+	0,125	1,0	0,016 – 1,5	-	-

\* CIM50% e CIM90% correspondem à concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

+ O CIM da azitromicina para os anaeróbios estritos ainda não foi estabelecido pelo NCCLS

**Tabela 6** - Suscetibilidade antimicrobiana dos *Fusobacterium necrophorum* contra 8 antibióticos.

<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=15)					
Antibióticos	CIM (µg/mL)*		Intervalo de CIM	Valores de CIM da NCCLS	Índice de suscetibilidade (%)
	50%	90%			
Penicilina G	0,016	1,0	0,016 – 3,0	≤ 0.5µg/mL	86,7%
Amoxicilina + ác. clavulânico	0,016	0,75	0,016 – 1,5	≤ 2µg/mL	100%
Amoxicilina	0,023	1,0	0,016 – 1,5	≤ 4 µg/mL	100%
Clindamicina	0,023	4,0	0,016 – 16,0	≤ 2µg/mL	86,7%
Metronidazol	0,032	0,047	0,016 – 64,0	≤ 8µg/mL	93,4%
Eritromicina	0,047	0,38	0,016 – 8,0	≤ 4µg/mL	73,3%
Cefaclor	0,094	2,0	0,016 – 4,0	≤ 16µg/mL.	100%
Azitromicina+	0,032	4,0	0,016 – 8,0	-	-

\* CIM50% e CIM90% correspondem à concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

+ O CIM da azitromicina para os anaeróbios estritos ainda não foi estabelecido pelo NCCLS

**Tabela 7** - Suscetibilidade antimicrobiana dos *Peptostreptococcus prevotii* contra 8 antibióticos.

<i>Peptostreptococcus prevotii</i> (n=13)					
Antibióticos	CIM ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )*		Intervalo de CIM	Valores de CIM da NCCLS	Índice de suscetibilidade (%)
	50%	90%			
Penicilina G	0,016	0,125	0,016 – 0,38	$\leq 0.5\mu\text{g}/\text{mL}$	100%
Amoxicilina + ác. clavulânico	0,016	0,094	0,016 – 0,19	$\leq 2\mu\text{g}/\text{mL}$	100%
Amoxicilina	0,016	0,064	0,016 – 0,094	$\leq 4\mu\text{g}/\text{mL}$	100%
Clindamicina	0,064	1,0	0,016 – 1,5	$\leq 2\mu\text{g}/\text{mL}$	100%
Metronidazol	0,25	2,0	0,016 – 3,0	$\leq 8\mu\text{g}/\text{mL}$	100%
Eritromicina	0,094	1,5	0,016 – 2,0	$\leq 4\mu\text{g}/\text{mL}$	100%
Cefaclor	0,125	2,0	0,016 – 4,0	$\leq 16\mu\text{g}/\text{mL}$	100%
Azitromicina+	0,19	1,5	0,016 – 2,0	-	-

\* CIM50% e CIM90% correspondem à concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

+ O CIM da azitromicina para os anaeróbios estritos ainda não foi estabelecido pelo NCCLS

**Tabela 8** - Suscetibilidade antimicrobiana das *Porphyromonas gingivalis* contra 8 antibióticos.

<i>Porphyromonas gingivalis</i> (n=11)					
Antibióticos	CIM (µg/mL)*		Intervalo de CIM	Valores de CIM da NCCLS	Índice de suscetibilidade (%)
	50%	90%			
Penicilina G	0,016	0,023	0,016 – 0,125	≤ 0.5µg/mL	100%
Amoxicilina + ác. Clavulânico	0,016	0,032	0,016 – 0,064	≤ 2µg/mL	100%
Amoxicilina	0,016	0,064	0,016 – 1,0	≤ 4 µg/mL	100%
Clindamicina	0,016	0,45	0,016 – 0,125	≤ 2µg/mL	100%
Metronidazol	0,064	0,75	0,016 – 1,5	≤ 8µg/mL	100%
Eritromicina	0,19	1,5	0,016 – 4,0	≤ 4µg/mL	91%
Cefaclor	0,023	0,064	0,016 – 0,19	≤ 16µg/mL.	100%
Azitromicina+	0,19	1,5	0,016 – 2,0	-	-

\* CIM50% e CIM90% correspondem à concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% e 90% dos isolados, respectivamente.

+ O CIM da azitromicina para os anaeróbios estritos ainda não foi estabelecido pelo NCCLS

## Endotoxina

A presença de microrganismos foi detectada por cultura em todas as amostras (intervalo  $10^2 - 5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônia - ufc). Em amostras de casos sintomáticos a mediana de ufc foi  $8.7 \times 10^5$  enquanto em casos assintomáticos a mediana foi  $5 \times 10^3$ . Intervalo de confiança para as médias de casos sintomáticos foi de  $6.8 \times 10^5 - 1.7 \times 10^6$  ufc, com média de  $1.7 \times 10^6$  ufc. Nos casos assintomáticos o intervalo foi  $1.8 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  ufc com média de  $9.1 \times 10^4$ .

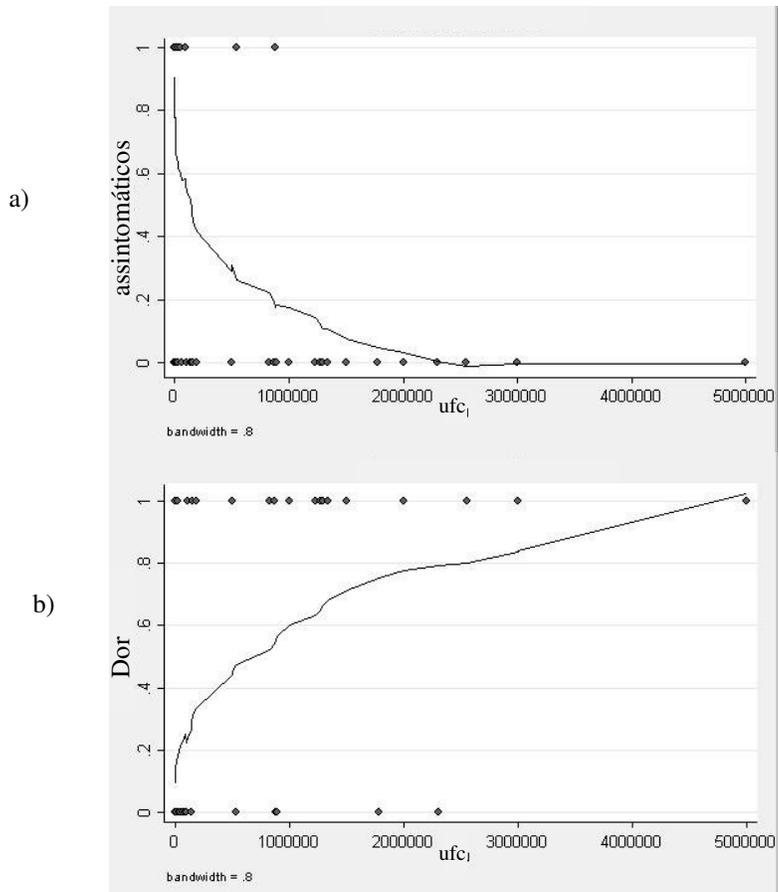
A Tabela 9 mostra os sinais e sintomas, ufc e concentração de endotoxinas detectada em cada paciente. Regressão logística foi usada para comparar os valores de ufc com os sintomas. Quando ufc foi comparada com casos assintomáticos uma associação log-negativa foi observada, indicando que à medida que os valores de ufc aumentam, o número de casos assintomáticos diminuem. O oposto foi observado quando ufc foi comparada com casos sintomáticos. Um gráfico de regressão logística foi criado para visualizar essa informação (Figura 4). No eixo vertical, “0” representa a presença de sintomas (i.e. casos sintomáticos), e “1” representa ausência de sintomas (i.e. assintomáticos). O eixo horizontal representa a quantidade de ufc. Os valores para cada paciente estão descritos na tabela 9.

O QCL-1000 indicou que endotoxinas estavam presentes em todas as amostras estudadas. O intervalo de endotoxinas quantificado na amostra foi 2390 – 22100 EUml<sup>-1</sup>. A mediana da concentração de endotoxinas em amostras de casos sintomáticos foi 20888 EUml<sup>-1</sup> enquanto em casos assintomáticos foi 15145 EUml<sup>-1</sup>. Intervalos de confiança para os

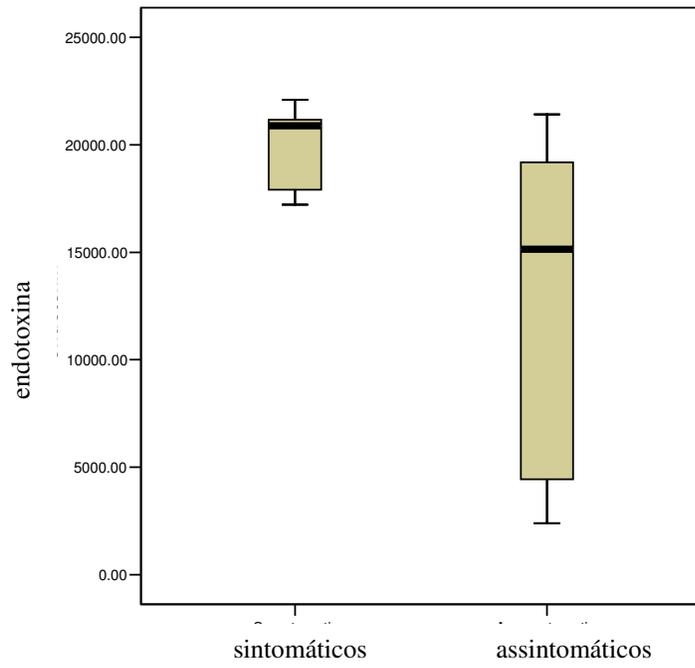
casos sintomáticos (16600 -20300) com média de 18500, e para casos assintomáticos (8300 - 15800) com média de 12000. Para os valores contínuos de endotoxinas, o gráfico mostra a concentração de endotoxinas presentes tanto em casos sintomáticos como em casos assintomáticos (Figura 5). Houve um amplo intervalo de valores da concentração de endotoxinas para casos assintomáticos, enquanto para casos sintomáticos houve um aumento significativo na concentração de endotoxinas e os valores foram maiores (Figura 5). As associações entre concentração de endotoxinas e a ocorrência de casos assintomáticos está demonstrada estatisticamente na figura 6a. A associação entre a concentração de endotoxinas quando cada sintoma estava presente é mostrada na figura 6(b-f). A linha de regressão mostra uma associação negativa entre a concentração de endotoxinas e casos assintomáticos, demonstrada pelo gradiente negativo da linha (Figura 6a). Por outro lado, há uma associação positiva entre endotoxina e dor espontânea, pois o gradiente da linha é positivo (Figura 6b). Um perfil semelhante foi observado quando a concentração de endotoxinas foi comparada com sintomas como dor à percussão, dor à palpação, edema e exsudato purulento (Figura 6b-f).

Tabela 9 - Sinais e sintomas, ufc e quantidade de endotoxinas para cada paciente. \*Assintomático, \*\*Dor à percussão, \*\*\*dor à palpação

Caso	Sinais e sintomas clínicos						ufc	endotoxina
	Assint*	dor	DPerc**	Dor palp***	edema	exsudato		
1	não	sim	não	sim	sim	sim	$3 \times 10^6$	4237,099
2	sim	não	não	não	não	não	$3,8 \times 10^3$	21419,099
3	não	sim	não	sim	sim	sim	$5 \times 10^6$	21974,276
4	não	não	não	sim	sim	não	$1,5 \times 10^5$	17427,569
5	sim	não	não	não	não	não	$4 \times 10^2$	15144,644
6	não	sim	sim	sim	sim	sim	$1,6 \times 10^5$	17671,656
7	não	sim	sim	sim	sim	sim	$8 \times 10^3$	17212,199
8	sim	não	não	não	não	não	$1,2 \times 10^3$	2433,009
9	não	sim	sim	sim	não	não	$2 \times 10^2$	5620,489
10	não	sim	sim	sim	não	não	$1,92 \times 10^5$	18269,906
11	sim	não	não	não	não	não	$9,8 \times 10^4$	20811,276
12	não	não	sim	sim	não	sim	$2,3 \times 10^6$	21663,186
13	sim	não	não	não	não	não	$10^3$	19184,034
14	não	não	não	não	sim	sim	$6,4 \times 10^4$	20926,141
15	não	sim	sim	sim	sim	sim	$2 \times 10^6$	19260,611
16	não	sim	sim	sim	sim	sim	$8,3 \times 10^5$	18992,594
17	não	não	não	sim	não	sim	$1,4 \times 10^5$	20887,852
18	não	sim	sim	sim	sim	sim	$5 \times 10^5$	21184,585
19	não	sim	sim	sim	sim	não	$1,27 \times 10^6$	20064,659
20	não	sim	sim	sim	sim	sim	$1,23 \times 10^6$	21634,471
21	não	sim	sim	não	não	não	$8,7 \times 10^5$	21026,647
22	não	não	não	sim	não	sim	$1,78 \times 10^6$	20361,392
23	não	não	sim	não	não	não	$8,9 \times 10^5$	21481,317
24	não	sim	não	sim	não	não	$1,34 \times 10^6$	21136,725
25	não	não	não	não	não	não	$1,5 \times 10^5$	19801,429
26	sim	não	não	não	não	não	$5 \times 10^4$	5208,893
27	não	sim	sim	sim	sim	sim	$5 \times 10^6$	21031,433
28	sim	não	não	não	não	não	$2 \times 10^2$	4797,296
29	não	não	sim	não	não	não	$1,2 \times 10^4$	18116,754
30	sim	não	não	não	não	não	$10^2$	2394,721
31	sim	não	não	não	não	não	$5,4 \times 10^5$	19188,821
32	não	sim	sim	sim	não	não	$1,3 \times 10^6$	22103,498
33	não	sim	sim	sim	sim	não	$2,7 \times 10^4$	12765,998
34	não	sim	sim	sim	não	sim	$1,1 \times 10^5$	21098,437
35	não	não	sim	não	não	não	$2 \times 10^4$	3505,074
36	sim	não	não	não	não	não	$6,2 \times 10^3$	20236,955
37	não	sim	sim	sim	não	sim	$10^6$	17719,516
38	sim	não	não	não	não	não	$9 \times 10^3$	17307,919
39	sim	não	não	sim	não	não	$2 \times 10^2$	2389,935
40	sim	não	não	não	não	sim	$5 \times 10^3$	16240,639
41	sim	não	não	não	não	não	$3,5 \times 10^4$	18557,067
42	sim	não	não	não	não	não	$9 \times 10^4$	5419,477
43	sim	não	não	não	não	não	$10^4$	10334,707
44	não	sim	sim	não	não	sim	$1,5 \times 10^6$	21514,819
45	não	sim	sim	não	não	sim	$3 \times 10^6$	20959,642
46	sim	não	não	não	não	não	$3 \times 10^2$	2886,722
47	sim	não	não	não	não	não	$8,8 \times 10^5$	20576,762
48	não	sim	não	sim	não	não	$5 \times 10^5$	21213,301
49	não	sim	sim	sim	sim	sim	$2,55 \times 10^6$	21141,511
50	sim	não	não	não	não	não	$10^3$	4084,181



**Figura 4** - Linha de regressão das unidades formadoras de colônia (ufc) em relação a casos assintomáticos (a) e casos de dor (b).



**Figura 5** - Quantidade de endotoxinas em casos sintomáticos e assintomáticos

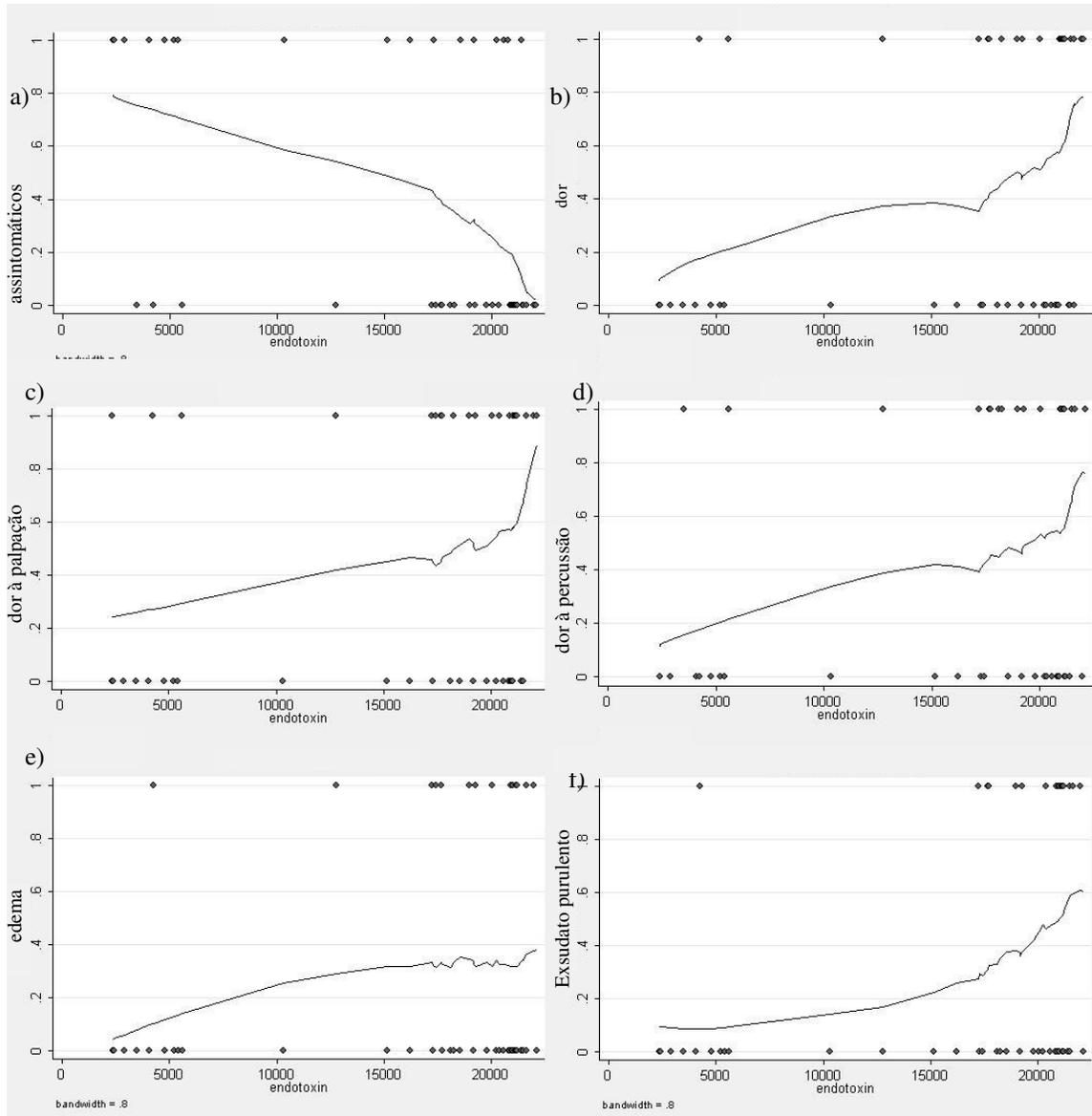


Figura 6: Linha de regressão da quantidade de endotoxinas em relação aos sinais e sintomas endodônticos. O eixo vertical indica a) Assintomático; b) dor c) dor à palpação d) Dor à percussão e) edema f) exsudato purulento.

## 6 - DISCUSSÃO

### MICROBIOTA DOS CANAIS RADICULARES E ASSOCIAÇÃO DE BACTÉRIAS COM SINAIS E SINTOMAS DE ORIGEM ENDODÔNTICA

Infecções endodônticas primárias correspondem a canais radiculares não tratados que foram invadidos e colonizados por microrganismos resultando em necrose pulpar. Bactérias que infectam o canal radicular podem ter acesso aos tecidos perirradiculares e dar início a reações inflamatórias conhecidas como doenças perirradiculares. Além disso, a infecção microbiana é um dos fatores etiológicos mais significantes no desenvolvimento de sinais e sintomas endodônticos (**Gomes *et al.* 1994**). O desenvolvimento de lesões sintomáticas geralmente depende da carga e virulência das bactérias presentes nos canais radiculares infectados e podem ser clinicamente classificadas como periodontite perirradicular aguda ou abscesso perirradicular agudo, dependendo do estágio da doença (**Walton & Torabinejad 1997**). Nesta pesquisa não houve a intenção de comparar a frequência das bactérias entre casos de periodontite perirradicular aguda e casos de abscesso devido à dificuldade de distinção entre os dois estágios. Com isso, estes casos foram referidos como infecções endodônticas sintomáticas num sentido genérico e estas foram comparadas a casos assintomáticos.

Microrganismos cultiváveis foram encontrados em quase todos os casos analisados. Em apenas um caso, que correspondia a um dente hígido e assintomático, não foram encontrados microrganismos. Resultados negativos, entretanto, podem não indicar ausência

total de bactérias, mas sim uma concentração bacteriana insuficiente para que ocorra o crescimento em meio de cultura. A porcentagem de diferentes espécies bacterianas por canal foi maior nos casos sintomáticos que nos casos assintomáticos, o que está de acordo com os estudos de **Yoshida *et al.* (1987)** e **Hashioka *et al.* (1992)**.

Nos canais radiculares analisados, houve uma prevalência de 4 a 6 espécies por canal em média, o que sustenta a afirmação de que as infecções endodônticas primárias são polimicrobianas (**Sundqvist, 1976; Yoshida *et al.*1987; Gomes *et al.*1994a,1996a; Baumgartner *et al.* 1999; Vaifae *et al.*1999; Oliveira *et al.* 2000; Jung *et al.* 2000 e Siqueira Jr. *et al.* 2001a**).

Dentre as espécies bacterianas isoladas neste estudo, houve uma predominância de anaeróbios estritos, correspondendo a cerca de 80 % do total de isolados microbianos. Apesar deste grande número de espécies anaeróbias isoladas, é possível que algumas espécies muito sensíveis à presença de oxigênio não tenham sido identificadas, a despeito dos cuidados tomados durante a execução da metodologia. As amostras foram inoculadas em meio de transporte apropriado e, em seguida, em meios de cultura pré-reduzidos altamente nutritivos. Estes foram prontamente incubados por tempo prolongado sob condições gasosas adequadas, evitando a perda de microrganismos de crescimento lento.

O meio de transporte utilizado neste estudo, o “Reduced Transport Fluid” (RTF), é eficiente em manter a viabilidade das células bacterianas e impedir a sua proliferação por até 24 horas em temperatura ambiente. Outro meio também bastante empregado é o “Viability

Medium Göteborg Ágar” (VMGA III), que também é eficaz para o transporte (**van Steenbergen et al. 1982**).

Como esperado, os meios empregados não permitiram o crescimento de todos os tipos de microrganismos, porque os mais fastidiosos como espiroquetas e micoplasmas não sobrevivem nos meios usados neste estudo. De fato, tais microrganismos não foram isolados, assim como *Tannerella forsythia*, previamente conhecida como *Bacteroides forsythus*, que é um microrganismo difícil de ser cultivado. Muitos outros estudos empregando método de cultura também falharam em isolar tais espécies de canais radiculares infectados (**Griffie et al. (1980), Yoshida et al. (1987), Sundqvist et al. (1989), Baumgartner & Falkler (1991), Hashioka et al. (1992), Gomes et al. (1994a), Sundqvist (1994), Gomes et al. (1996a,b), Baumgartner et al. (1999), Villanueva (2002)**). No entanto, com a introdução dos métodos moleculares, espécies de treponemas como *T. denticola* (**Siqueira Jr et al 2001, Roças et al. 2001, Baumgartner et al 2003, Gomes et al. 2006**) ou *T. socranskii* (**Siqueira Jr e Roças 2003, Baumgartner et al. 2003**) ou *T. forshytia* (**Conrads et al. 1997, Gomes et al. 2006a**) passaram a figurar como possíveis patógenos endodônticos.

Até o presente momento, não existe um único método que seja capaz de isolar todos os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares. Desta maneira, testes bacteriológicos devem ser usados conjuntamente com testes imunológicos (i.e. ELISA, “slot blot”, imunofluorescência indireta), sondas de DNA, “polymerase chain reaction (PCR) amplification”, para detectar uma maior gama de espécies bacterianas. Contudo não podemos esquecer que a cultura é a única técnica que pode diferenciar células viáveis de

células mortas, sendo um método útil, pois casos que não respondem ao tratamento podem se beneficiar de uma investigação microbiológica, onde poderá também ser avaliada a suscetibilidade microbiana aos antibióticos ou agentes quimioterapêuticos.

A despeito da alta porcentagem de anaeróbios estritos nos casos assintomáticos, a presença desses microrganismos foi estatisticamente relacionada com dor espontânea e dor à percussão, especialmente os anaeróbios estritos Gram-negativos, o que confirma os resultados de **Griffie *et al.* (1980); Yoshida *et al.* (1987); Sundqvist *et al.* (1989) e Gomes *et al.* (1994a,1996a).**

Presença de dor espontânea no momento da coleta foi significativamente associada com anaeróbios Gram-negativos tais como *Prevotella* spp. e *Bacteroides* spp.; dor prévia foi associada a *Prevotella loescheii* e *Peptostreptococcus* spp., concordando com os achados de **Griffie *et al.* (1980) e Gomes *et al.* (1994a, 1996a, 2002).** No entanto, outros estudos como os de **Baumgartner *et al.* (1999) e Makkar *et al.* (1999)** não encontraram relação significativa entre a presença de grupos bacterianos específicos e dor espontânea e outros sinais e sintomas clínicos.

O teste da percussão avalia clinicamente a presença de uma reação inflamatória nos tecidos periapicais e facilita a localização do dente causador da dor (**Gomes 2002**). No presente estudo, dor à percussão foi relacionada à presença de *Bifidobacterium* spp., *Actinomyces* spp., *Streptococcus constellatus*, *Peptostreptococcus* spp. e *Propionibacterium propionicum*. Por outro lado, a despeito de uma alta incidência de *Peptostreptococcus* spp.,

*Porphyromonas* spp. e *Bacteroides* spp., **Hashioka et al. (1992)** não encontraram associações entre bactérias específicas e dor à percussão.

A presença de edema relacionado ao dente é geralmente um sinal clínico de processo agudo na região periapical, que, freqüentemente, tem a presença de microrganismos como seu fator etiológico. Neste estudo, edema foi associado com a presença de *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus prevottii* e *Streptococcus anginosus*. Associações de edema com estes microrganismos, dentre outros, também foram encontradas por **Gomes (2002)**, **Jacinto et al. (2003)**.

**Griffie et al. (1980)** relataram a possível associação entre dor à palpação, um importante exame no diagnóstico de abscessos periapicais, e a presença de BPPN, o que também foi observado neste estudo, mas contrasta com os achados de **Jung et al. (2000)**, onde edema não foi associado a nenhum microrganismo específico.

*F. nucleatum* foi a espécie bacteriana encontrada em maior freqüência nas amostras deste estudo. Este microrganismo é uma bactéria anaeróbia estrita, Gram-negativa, não formadora de esporos e sem motilidade que é normalmente isolada da cavidade oral. Estudos epidemiológicos têm demonstrado que esta espécie é uma das mais prevalentes em infecções endodônticas primárias (**Sundqvist 1992**, **Jung et al. 2000**, **Sakamoto et al. 2006**). Além disso, o *F. nucleatum* age como uma ponte de coagregação entre microrganismos, sendo desta forma um dos principais microrganismos na formação do biofilme (**Kolenbrander 2000**); podendo ser também um agente causador ou contribuir para a reagudização das

infecções endodônticas devido a presença de endotoxinas na sua parede celular (**Villanueva 2002**). **Baumgartner et al. (1992)** mostraram que uma cultura mista de *F. nucleatum* é significativamente mais patogênica do que este microrganismo em cultura pura, o que está de acordo com os achados deste estudo, onde *F. nucleatum* foi sempre encontrado associado a outros microrganismos e esteve estatisticamente associado à presença de edema e exsudato purulento.

A implicação dos BPPN na etiologia da infecção endodôntica e periodontite apical já foi relatada por uma série de autores (**Sundqvist et al. 1989; van Winkelhoff et al. 1992; Dougherty et al. 1998; Baumgartner et al. 1999; Oliveira et al. 2000; Siqueira Jr et al. 2001a**). É provável que a atividade proteolítica dos BPPN seja um fator de virulência altamente significativa, porque proteinases desses microrganismos têm efeito nas proteínas plasmáticas envolvidas no processo de defesa do organismo (**Sundqvist et al. 1989**).

Os microrganismos deste grupo são bastonetes Gram-negativos, anaeróbios estritos, imóveis e não esporulados que, quando cultivados sobre a superfície de uma placa de ágar-sangue desenvolvem colônias pigmentadas de negro por produzirem pigmentos do tipo protoheme ou protoporfirina. São espécies de suma importância nas infecções orais e possuem um papel principal na patogênese da doença periodontal e infecções endodônticas (**Nisengard & Newman, 1997**).

O interesse na microbiota dos canais radiculares se renovou após os bacilos produtores de pigmento negro (BPPN) serem isolados de canais radiculares e da correlação

destas bactérias com os aspectos clínicos, tais como dor, mau odor, exsudato, formação de abscessos, presença de fístula, entre outros (**Sundqvist, 1976; Griffie et al.1980; Haapasalo et al. 1989; Gomes et al.1994a, Jacinto et al. 2003**).

Os BPPN pertencem à família *Bacteroidaceae* e correspondem a algumas espécies do gênero *Prevotella* altamente sacarolíticas (*P. melaninogenica*, *P. denticola* e *P. loescheii*), moderadamente sacarolíticas (*P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. pallens*, *P. corporis*, *P. tanneriae*) e três espécies assacarolíticas de origem humano do gênero *Porphyromonas* (*P. gingivalis*, *P. endodontalis* e *P. asaccharolytica*).

Os BPPN são comumente isolados em combinação com outras bactérias, compondo infecções mistas. Evidências sugerem a existência de sinergismo bacteriano, que seria um fator determinante do potencial patogênico destas espécies (**Baumgartner et al.1992**). A grande maioria das cepas de BPPN não tem capacidade de estimular o desenvolvimento de abscessos em culturas puras. Em infecções mistas induzidas em tecido conjuntivo subcutâneo de rato, *Prevotella intermedia* e *Porphyromonas endodontalis* estimulam o desenvolvimento de abscessos localizados, enquanto que aquelas que contêm *Porphyromonas gingivalis* induzem abscessos disseminados (**van Steenberg et al.1982; van Winkelhoff et al.1985; Sundqvist, 1993**). Realmente, BPPN foram sempre encontrados associados a outras bactérias, o que também confirma a relação sinérgica entre bactérias encontradas em infecções polimicrobianas. Os BPPN têm requerimentos nutricionais específicos que são fornecidos por determinadas bactérias, como por exemplo, menadiona que, liberada por bactérias do gênero *Veillonella*, supre a necessidade de vitamina K, e succinato, produzido

por *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp. ou *Peptostreptococcus* spp. que pode substituir hemina e vitamina K como fator de crescimento dos BPPN (**Sundqvist, 1994**).

Testes bioquímicos convencionais não diferenciam *P. intermedia* de *Prevotella nigrescens*, uma vez que são fenotipicamente idênticas. No entanto, podem ser diferenciadas por métodos moleculares através do perfil de suas proteínas celulares (**Stubbs et al.1999**). Estudos têm sugerido que *P. nigrescens* é o BPPN mais frequentemente isolado das infecções endodônticas (**Gharbia et al.1994; Bae et al. 1997; Baumgartner et al.1999**). Neste estudo, *Prevotella intermedia/nigrescens* foi a BPPN isolada em maior frequência. No total, as BPPN foram encontradas em 44,4% dos canais radiculares. Setenta e cinco por cento deles foram isolados de canais radiculares de dentes de pacientes com dor espontânea e 20% estavam presentes em canais de pacientes que não estavam com dor no momento da coleta, mas que relataram dor prévia.

Neste estudo, BPPN foram associadas à presença de dor espontânea e presença de exsudato no canal radicular. Por outro lado, **Siqueira Jr et al. (2001a)**, usando métodos moleculares, relataram que, a despeito da alta prevalência de BPPN em dentes sintomáticos, eles também foram encontrados em muitos dentes assintomáticos, indicando que não há relação aparente entre a presença dessas bactérias e sinais e sintomas endodônticos, contradizendo os achados de **Sundqvist et al. (1989), Hashioka et al. (1992), Gomes et al. (1994a, 1996a) e Gomes (2002)**, que usaram métodos de cultura e **Gomes et al. (2005)** que compararam métodos de cultura com métodos moleculares.

Atualmente, métodos moleculares têm identificado espécies dos canais radiculares infectados que são difíceis de serem cultivadas, como por exemplo, *T. forsythia* e *T. denticola* (Siqueira *et al* 2001, Rocas *et al.* 2003, Gomes *et al.* 2006). Tais pesquisas não encontraram nenhuma relação entre aspectos clínicos e bactérias específicas. Contudo, não podemos esquecer que metodologias usadas nos trabalhos citados acima determinam a presença de microrganismos, mas não o número total de bactérias coletadas na amostra. Greeff *et al.* (1998) encontraram níveis mais altos de *P. gingivalis* em amostras de casos com periodontite que em casos de indivíduos saudáveis usando o Real Time PCR, um método que determina as quantidades absolutas e relativas de um microrganismo específico em uma amostra mista, independente da cultura. Isso aponta para a importância de se considerar quando métodos moleculares são utilizados, não apenas a presença de um microrganismo específico, mas também o número de cepas na amostra, para que se possa associá-lo com os sinais e sintomas clínicos. Nos métodos de cultura, um microrganismo não pode ser detectado se não estiver presente em concentrações altas o suficiente para crescer nos meios de cultura. Isso pode ter contribuído para a associação de microrganismos específicos com os sinais e sintomas, quando tal método é utilizado.

Neste estudo obtivemos evidências de que grupos bacterianos específicos, principalmente bactérias anaeróbias Gram-negativas, estão associados aos sinais e sintomas de origem endodôntica como dor espontânea, dor prévia, dor à palpação, dor à percussão e edema e que, geralmente, estas infecções endodônticas primárias são polimicrobianas.

## TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Durante a terapêutica aplicada às infecções endodônticas o debridamento de tecido necrótico e drenagem de coleções purulentas são procedimentos essenciais. Contudo, alguns casos de infecções periapicais agudas apresentam sinais e sintomas de disseminação do processo infeccioso, tais como febre, mal estar, edema ou celulite e trismo. Nesses casos, o uso de antibióticos por via sistêmica, atuando como coadjuvante à terapia endodôntica, está indicado (**Bergenholtz & Crawford, 1989; Abbott *et al.*1990; Grad, 1997; Andrade, 2002**). Antibióticos podem também ser usados para profilaxia antibiótica em algumas situações como: pacientes de risco à endocardite bacteriana, antes da cirurgia endodôntica, após avulsão e reimplante do dente (**Abbott *et al.*1990**).

O estabelecimento dos padrões de suscetibilidade antimicrobiana em bactérias patogênicas é um passo essencial para o desenvolvimento de diretrizes antimicrobianas. Em odontologia, quando o uso de uma droga antimicrobiana é necessário, a escolha do antibiótico é baseada nas pesquisas dos padrões de suscetibilidade encontrados na literatura.

Está estabelecido que bactérias anaeróbias podem causar uma série de infecções em humanos, e que elas estão se tornando gradativamente resistentes a muitos antibióticos tradicionalmente usados contra anaeróbios (**Tamaka-bandon *et al.* 1995**). Realmente, nos últimos anos, resistência a diferentes agentes antimicrobianos tem sido freqüentemente descrita no mundo todo e os padrões de suscetibilidade estão se tornando menos previsíveis

(**Bianchini et al 1997**). Estes fatos enfatizam a necessidade do freqüente estudo da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas.

O *epsilometer test* (E-test) é um teste comercial baseado no princípio da difusão de um gradiente antimicrobiano num meio agar, com o objetivo de determinar a concentração inibitória mínima (MIC) do antibiótico para inibir o crescimento do microrganismo que está sendo testado. Este método consiste de uma fita plástica impregnada com o gradiente do antibiótico em um dos lados e uma escala interpretativa do outro.

Embora correlações aceitáveis deste método com técnicas padrão tenham sido relatadas (**Citron et al. 1991, Croco et al. 1995**), algumas discrepâncias também já foram descritas (**Jorgensen & Ferraro 1998**). Este teste difere de outros métodos comerciais na flexibilidade de seleção da droga. Contudo, o alto custo é uma das principais limitações para o uso deste teste. **Nachnani et al. (1992)**, usando o método padrão de diluição em agar como controle, validou o método do E-test para teste de suscetibilidade antimicrobiana de microrganismos isolados de infecções periodontais, utilizando cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC) como controle. Eles encontraram alto percentual de concordância e alta sensibilidade para todos os antibióticos de ambos os grupos de bactérias, documentando desta forma a potencial viabilidade de se usar o E-test como um método rápido e confiável de se testar a suscetibilidade antimicrobiana de patógenos orais.

Neste estudo, os anaeróbios estritos *F. nucleatum*, *P. oralis*, *P. intermedia/nigrescens*, *P. micros*, *P. prevottii*, *F. necrophorum* e *P. gingivalis*, que foram isolados com grande

freqüência dos canais radiculares infectados foram analisados quanto a sua suscetibilidade antimicrobiana contra oito antibióticos. De uma forma geral, estes microrganismos se mostraram altamente sensíveis a amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico, clindamicina, cefaclor, eritromicina, metronidazol e penicilina G. Embora alguma resistência tenha sido observada, normalmente as MICs estavam substancialmente abaixo das concentrações críticas.

Como via de regra, um período de 24 horas de incubação não é suficiente para obter um resultado de E-test possível de ser interpretado, quando se testa cepas de anaeróbios estritos. Estudo de **Rosenblatt & Gustafson (1995)** relatou que 64% das cepas anaeróbias testadas pelo E-test puderam ser interpretadas após 24 horas de incubação. No entanto, 95% dos mesmos testes puderam ser interpretados após 48 horas de incubação, semelhante ao que ocorreu no presente estudo.

Nesta pesquisa, as MICs foram baseadas nos critérios da NCCLS. As concentrações inibitórias mínimas determinadas pela NCCLS têm sido usadas em vários estudos bacteriológicos (**Nachani et al. 1992; van-Steenbergen et al. 1993; Rosenblatt & Gustafson, 1995; Conti et al. 1999; Poulet et al. 1999; Kuriyama et al. 2000; Kuriyama et al. 2001**). Entretanto as CIM determinadas pela NCCLS podem ser muito rigorosas para alguns antibióticos, uma vez que estão abaixo da concentração do antibiótico nos tecidos. Além disso, cepas resistentes a um certo antibiótico de acordo com o critério da NCCLS, clinicamente podem ser suscetíveis a este antibiótico, pois pode haver influência de outros fatores, como a localização da infecção ou a dose administrada (**Kuriyama et al. 2000**).

Penicilina G é uma das penicilinas naturais mais usadas, sendo o antibiótico parenteral de escolha quando um efeito rápido ou uma alta concentração de droga no sangue é necessária (**Tortora et al. 2000**). Os microrganismos testados neste estudo, tiveram elevada suscetibilidade a Penicilina G. No entanto, 3 cepas de *Prevotella intermedia/nigrescens* (n=17), 1 cepa de *F. nucleatum* (n=30) e 2 cepas de *F. necrophorum* (n=15) foram resistentes a este antibiótico. **van Winkelhoff et al. (2005)** encontraram 25% de cepas resistentes a Penicilina G numa população holandesa e 38,9 % numa população espanhola. No entanto, não encontraram nenhuma cepa de *F. nucleatum* resistente a Penicilina G na população holandesa, enquanto 20% das cepas de *F. nucleatum* oriundas da população espanhola foram resistentes. **Kuriyama et al. (2000)** encontraram cerca de 10% das cepas de *Fusobacterium necrophorum* resistentes a penicilina G. A maioria das cepas de *Prevotella intermedia/nigrescens* testadas por **Dahlén et al. (1990)** foi sensível à penicilina G. Já **Appelbaum et al. (1990a)** encontraram 52% das cepas de *P. intermedia/nigrescens* resistentes à penicilina devido à produção de  $\beta$ -lactamase.

A diferença nos resultados dos vários estudos pode ser devido as diferentes épocas em que foram realizadas as pesquisas, diferentes sítios de coleta dos microrganismos (e.g. endodôntico ou periodontal) ou devido as diferentes áreas geográficas onde foram feitos os testes; o que comprova a necessidade de estudos como este serem realizados periodicamente para avaliar a eficácia dos antibióticos. Além disso, essas diferenças indicam uma dificuldade em se estabelecer um protocolo universal para uso de antibiótico no tratamento das infecções orais (**van Winkelhoff et al. 2005**).

Todos anaeróbios estritos testados foram, neste estudo, suscetíveis à amoxicilina e amoxicilina + ácido clavulânico. **Baumgartner et al. (1999)** encontraram 89% e 98% dos anaeróbios isolados de abscessos endodônticos suscetíveis a amoxicilina e a amoxicilina + ácido clavulânico, respectivamente. **Kleinfelder et al. (2000)** testaram a suscetibilidade de cepas de *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. micros* e *P. oralis* a amoxicilina + ácido clavulânico, onde encontraram 100% de susceptibilidade. **Khemaleelakul et al. (2002)** encontraram 15% dos anaeróbios estritos isolados de infecções endodônticas agudas resistentes à amoxicilina, enquanto nenhuma cepa foi resistente à amoxicilina mais ácido clavulânico.

A amoxicilina é uma penicilina de amplo espectro de ação. Ela foi desenvolvida para atingir determinadas espécies Gram-negativas, particularmente *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (**Moening et al. 1989**). Resistência à amoxicilina já foi documentada entre os gêneros das *Prevotellas*, *Pophyromonas*, *Bacteroides* e *Fusobacterium* (**Dubreuil et al. 1995**), e também para algumas bactérias anaeróbias Gram-positivas isoladas de ambiente hospitalar (**Dubreuil et al. 1995, Dubreuil 1993**). No entanto, vários estudos avaliando cepas isoladas da cavidade oral e do canal radicular vão de acordo com os altos índices de suscetibilidade das bactérias anaeróbias a amoxicilina encontrados no presente estudo (**Baumgartner & Xia 2003, Sousa et al. 2003**). A amoxicilina tem sido recomendada como um antibiótico de primeira escolha para atuar como coadjuvante no tratamento de infecções dentais, principalmente devido ao seu amplo espectro de ação, ação prolongada e habilidade de competir com a absorção dos alimentos (**Woods 1981, 1985, Abu-Fanas et al. 1991**). Contudo, a amoxicilina pode causar efeitos colaterais gastrointestinais,

hipersensibilidade e o desenvolvimento de cepas resistentes, além de ser inativada pela  $\beta$ -lactamase (**Walker 1996**)

Cefaclor também foi eficaz contra todos os anaeróbios estritos testados neste estudo. **Cullmann et al. (1993)** encontraram algumas cepas de *F. nucleatum*, *Prevotella* spp., e *Peptostreptococcus* spp. resistentes ao cefaclor. Contudo, as cepas testadas eram provenientes de infecções hospitalares. **Pajukanta et al. (1994)** encontraram 82% das cepas de *P. gingivalis* suscetíveis ao cefaclor. Apesar de apresentar poucos efeitos colaterais e amplo espectro de ação, as cefalosporinas não devem ser prescritas para pacientes que apresentem reação de hipersensibilidade imediata à penicilina, uma vez que eles podem também ser alérgicos a outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (**Kuriyama et al.2000**).

Eritromicina e clindamicina têm sido prescritas para pacientes alérgicos à penicilina. Todavia, pesquisas têm mostrado que eritromicina não é efetiva contra *Fusobacterium* spp. (**Kuriyama et al. 2001, Sousa et al. 2003, Chan & Chan 2003**). A eritromicina tem um espectro de ação similar ao da penicilina G, mas não atinge altas concentrações no sangue, além disso, é menos efetiva contra alguns importantes microrganismos anaeróbios (**Moening et al. 1989**). No presente estudo, eritromicina foi efetiva contra 70% das cepas de *F. nucleatum*, 91 % das cepas de *P. gingivalis* e 73,3% das cepas de *F. necrophorum*. Todos os outros microrganismos testados foram sensíveis à eritromicina.

Clindamicina é um potente antibiótico tanto contra anaeróbios facultativos como contra anaeróbios estritos, incluindo bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase (**Sandor et al. 1998**). Pesquisas têm comprovado a eficiência da clindamicina contra anaeróbios Gram-negativos, particularmente BPPN (**Nachnani et al. 1992; van-Steenbergen et al. 1993; Kuriyama et al. 2000**). No presente estudo, este antimicrobiano apresentou bons resultados. Entretanto não foi 100% efetiva contra as cepas testadas, pois 3 cepas de *F. necrophorum*, 1 de *F. nucleatum* e 1 de *P. intermedia/nigrescens* foram resistentes a clindamicina. Uma vez que a terapia com clindamicina tem sido associada à colite pseudomembranosa, seu uso deve ser limitado a infecções severas onde drogas menos tóxicas não foram efetivas.

Clindamicina e metronidazol podem ser recomendados para pacientes nos quais a terapia antimicrobiana com penicilina ou amoxicilina, que são aos antibióticos de primeira escolha, tenha falhado (**Lewis et al. 1993**). Amoxicilina + ácido clavulânico também pode ser uma boa escolha (**Conti et al. 1999**). Por outro lado, o alto custo da amoxicilina + ácido clavulânico é um fator limitante na escolha deste medicamento (**Lewis et al. 1993**).

Metronidazol é um composto de nitroimidazol, desenvolvido para tratar infecções por protozoários, mas que também mostrou-se efetivo contra anaeróbios estritos. Com isto, não é recomendado que este antibiótico seja usado sozinho para o tratamento de infecções endodônticas, as quais são mistas e também contêm microrganismos facultativos. Neste estudo, metronidazol foi efetivo contra grande parte dos anaeróbios estritos testados. No entanto, 17,7% das cepas de *P. intermedia/nigrescens* e 6,6% das cepas de *F. necrophorum* foram resistentes ao metronidazol. Estudos têm comprovado que a associação do

metronidazol à penicilina V ou amoxicilina aumenta a efetividade das penicilinas **(Baumgartner & Xia 2003; Khemaleelakul *et al.* 2002).**

Padrões de resistência microbiana a antibióticos podem mudar ao longo dos anos, o que enfatiza a necessidade de contínuas pesquisas testando a suscetibilidade aos antimicrobianos; melhorando desta forma, a seleção acurada da terapia antibiótica inicial nos casos onde ela é necessária para atuar como um coadjuvante do tratamento endodôntico. Como resistência não pode ser prevenida, o seu progresso deve ser controlado pela redução da administração de antibióticos e restrição do seu uso para os casos onde são realmente necessários.

No presente estudo, foi possível concluir que o método do E-test é fácil de ser realizado e traz resultados relevantes quanto a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias estritas freqüentemente isoladas de canais radiculares infectados. Nosso estudo encontrou que todas as cepas testadas foram 100% suscetíveis à amoxicilina, amoxicilina + ácido clavulânico e cefaclor. Além disso, altos índices de suscetibilidade dos microrganismos testados foram encontrados contra os demais antibióticos.

Apesar do índice de suscetibilidade encontrado ter sido alto, a resistência a penicilina G deve ser levada em consideração. Todavia, são necessários estudos envolvendo um número maior de cepas para que se possa fazer qualquer afirmação. Mais ainda, estes estudos deverão considerar o desenvolvimento de resistência bacteriana de acordo com a localização geográfica de onde são coletadas as amostras.

# Endotoxina

A parede celular de bactérias Gram-negativas, como os BPPN ou *Fusobacterium*, contém endotoxinas, que são chamadas de lipopolissacarídeos (LPS). O LPS é um importante fator de virulência, uma vez que exerce uma série de efeitos biológicos que resultam na amplificação de reações inflamatórias (**Farber & Seltzer, 1988**). Endotoxinas são antígenos não específicos que são fracamente neutralizados pelos anticorpos. Elas são também capazes de ativar uma reação em cascata do sistema complemento sem a presença de anticorpos. A ativação do sistema complemento gera anafilotoxinas, que são potentes vasodilatadores e apresentam quimiotaxia para neutrófilos e monócitos. Além disso, estes polipeptídeos ativam plaquetas, mastócitos, basófilos e células endoteliais. A ativação do sistema complemento também envolve a formação de cinina, prostaglandina e bradicinina, que são importantes mediadores da inflamação e indutores de reabsorção óssea (**Seltzer & Farber, 1994**). Em nosso estudo, assim como nos estudos de **Hashioka et al. (1992)** e **Gomes et al. (1994a, 1996a)** bactérias Gram-negativas foram estatisticamente associadas a dor espontânea, dor prévia, dor à palpação e edema.

O presente estudo focalizou a relação entre a concentração de endotoxinas presente em canais radiculares de dentes infectados com sinais e sintomas endodônticos. Amostras foram coletadas de dentes sintomáticos e assintomáticos, usando técnicas assépticas e tomando especial cuidado para evitar contaminação com endotoxinas de outras áreas que não o canal radicular. Um teste cromogênico de lisado de amebócito de *limulus* (LAL) (QCL-1000) foi usado para medir as endotoxinas encontradas em canais radiculares.

Este método utiliza um lisado de amebócitos de *limulus* modificado e um substrato produtor de cores sintéticas para detectar e quantificar cromogenicamente endotoxinas de bactérias Gram-negativas. Recentes relatos de **Khabbaz et al. (2000, 2001)** também usaram este método para quantificar endotoxinas presentes em cáries dentais e tecidos pulparens inflamados, que provaram ser confiáveis até mesmo para identificar baixas concentrações de endotoxina.

Devido à sua sensibilidade, outros produtos além das endotoxinas, como por exemplo, proteínas, ácidos nucléicos, peptidoglicanos de bactérias Gram-positivas e compostos do exsudato inflamatório podem interferir com o método, induzindo ou dando resultados falso positivo ou falso negativo. Contudo, diluições das amostras em água do reagente *Lisado de Amebócito de Limulus* (LAL) até  $10^{-4}$  e aquecimento a 70 °C foram realizados no presente estudo para a remoção de produtos não específicos como relatado por **Friberger et al. (1982)**.

Canais radiculares infectados são caracterizados por infecções polimicrobianas e dentes sintomáticos tendem a alojar um número maior de bactérias que os assintomáticos (**Sundqvist et al. 1989, Jacinto et al. 2003**). Na presente pesquisa, a média de unidades formadoras de colônia foi maior nos casos sintomáticos (média  $1.43 \times 10^6$ ) que nos casos assintomáticos (média  $9.1 \times 10^4$ ). Muitas espécies de bactérias têm sido isoladas de infecções endodônticas em dentes sintomáticos, com uma predominância de anaeróbios estritos Gram-negativos, especialmente *Fusobacterium* spp. e bactérias produtoras de pigmento negro

(Yoshida *et al.* 1987; Hashioka *et al.* 1992; Gomes *et al.* 1994, 1996a, 1996b, 2004; Jacinto *et al.* 2003).

Endotoxinas são potentes agentes inflamatórios e ativam as vias clássicas e alternativas do sistema complemento (Morrison & Kline, 1977). A ativação do complemento libera peptídeos biologicamente ativos, os quais desencadeiam um número de aspectos do processo inflamatório, como por exemplo, aumento da permeabilidade vascular e atração quimiotática de leucócitos polimorfonucleares (PMNs) e macrófagos. No presente estudo, 19 dos casos sintomáticos foram associados com exsudato purulento e uma correlação positiva foi encontrada entre a presença de exsudato purulento e a concentração de endotoxinas. Simon *et al.* (1971) encontrou uma correlação estatisticamente significativa entre a quantidade de endotoxinas em exsudatos gengivais e o grau clínico da inflamação gengival.

Uma associação positiva foi encontrada entre casos com sinais e sintomas endodônticos como dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação, edema e exsudato purulento e a concentração de endotoxinas, enquanto uma associação negativa foi encontrada entre a presença de endotoxinas nos canais radiculares e os dentes assintomáticos.

Horiba *et al.* (1991) examinaram o conteúdo de endotoxinas das amostras obtidas de 30 dentes unirradiculares portadores de periodontite apical. Seus resultados mostraram que não apenas os dentes com sintomas clínicos contêm altos níveis de endotoxinas, mas também que as taxas de detecção de endotoxinas e a mediana do conteúdo de endotoxina foram

maiores nos dentes com exsudato que nos dentes com canais radiculares secos, o que suporta os achados do presente estudo. Por outro lado, **Wesselink *et al.* (1978)** investigando o papel das endotoxinas através de um modelo experimental que simula o canal radicular concluíram que a toxicidade primária das endotoxinas extraídas do lipopolissacarídeo B não influenciaram o início e a manutenção de inflamações periapicais crônicas. A avaliação foi feita histologicamente pela procura dos sinais da reação de Swartzman.

A concentração de endotoxinas encontradas em todos os casos deste estudo foi maior que as relatadas em estudos prévios (**Dahlén & Bergenholtz, 1980, Horiba *et al.* 1991, Khabbaz *et al.* 2000, 2001; Schein & Schilder, 1975**). Contudo, não é possível comparar os números deste estudo com os outros devido a diferenças de protocolos ou aspectos clínicos investigados. **Dahlén & Bergenholtz (1980)** aspiraram com uma seringa os conteúdos suspensos no canal e transferiram para 1 ml de solução de NaCl estéril. **Kabbaz *et al.* (2001)** analisaram casos com pulpíte irreversível, os tecidos pulparem foram removidos com extirpa-nervos e então transferidos para um tubo apirogênico pré-pesado. No presente estudo apenas dentes com canais infectados e presença de lesão periapical foram analisados e 5 cones de papel absorvente foram inseridos no comprimento total de cada canal por 1 minuto; com o objetivo de remover exaustivamente todo o conteúdo de endotoxinas que infectava o dente. Conseqüentemente, uma alta concentração de endotoxinas já era esperada, até mesmo nos casos assintomáticos.

Outros fatores patogênicos além das endotoxinas podem estar envolvidos no processo inflamatório que se instala na região periapical adjacente ao canal radicular.

Contudo, a concentração de endotoxina no canal radicular de dentes com tecido pulpar necrótico encontrada neste estudo e a alta concentração de endotoxinas em casos de dentes com dor espontânea, dor à percussão e exsudato purulento indica que o LPS é um significativo fator biológico para o desenvolvimento da inflamação periapical aguda. Além disso, microrganismos e seus produtos, como endotoxinas, liberados numa infecção endodôntica podem disseminar sistemicamente, resultando no início ou exacerbação de uma doença sistêmica ou em danos a tecidos distantes do local da infecção (**Debelian *et al.*1995, Murray & Saunders, 2000**). Com isso, evidencia-se a necessidade de se utilizar, durante o tratamento endodôntico, substâncias que não apenas ajam como agentes antimicrobianos, mas que também tenham a habilidade de inativar produtos bacterianos, como por exemplo, as endotoxinas. A irrigação abundante e freqüente também é necessária para remover debris e endotoxinas.

Este estudo demonstrou que endotoxinas estão presentes em altas concentrações em canais radiculares de dentes infectados com sintomas endodônticos e que há uma correlação positiva entre os sinais e sintomas endodônticos e a concentração de endotoxinas nos canais radiculares infectados.

## 7 - CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos e nas condições experimentais deste estudo, podemos concluir que:

1. Infecções endodônticas primárias são polimicrobianas com predomínio de microrganismos anaeróbios estritos.
2. Grupos bacterianos específicos, principalmente anaeróbios Gram-negativos e bacilos produtores de pigmento negro, estão associados a sinais e sintomas de origem endodôntica como: dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação e edema.
3. A amoxicilina é o antibiótico de primeira escolha no tratamento das infecções de origem endodôntica. A associação de amoxicilina com ácido clavulânico deve ser reservada para casos onde não houve resposta à amoxicilina.
4. Endotoxinas estavam presentes em altas concentrações em canais radiculares de dentes infectados com sintomas endodônticos e há uma correlação positiva entre os sinais e sintomas endodônticos e a concentração de endotoxinas nos canais radiculares infectados. LPS é um fator biológico importante para o desenvolvimento de inflamação periapical aguda.

## 8- REFERÊNCIAS\*

1. Abbott PV, Hume WR, Pearman JW. Antibiotics and endodontics. Aust Dent J 1990; 35(1): 50-60.
2. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. Int Endod J 1998; 31(1): 39-47.
3. Abu-Fanas SH, Drucker D.B., Hull, Reeder J.C., Ganguli L.A. Identification and susceptibility to seven antimicrobial agents, of 61 gram-negative anaerobic rods from periodontal pockets. J Dent 1991;19(1): 46-50.
4. Alcoforado GAP, MacKay TL, Slots J. Rapid method for detection of lactose fermentation oral microorganisms. Oral Microbiol Immunol 1987; 2: 35-38.
5. Andrade ED. *Terapêutica medicamentosa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 1ª ed. 2002: 188.
6. Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR.  $\beta$ -lactamase production and susceptibilities to amoxicillin, amoxicillin/clavulanate, ticarcillin, ticarcillin/clavulanate, cefoxitin, imipenem and metronidazole, of 320 non-*Bacteroides fragilis* isolates and 129 fusobacteria from 28 U.S. centers. Antimicrob Agents Chemother 1990a; 34: 1546-1550.

---

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

7. Appelbaum PC, Spangler SK, Jacobs MR. Evaluation of two methods for rapid testing for beta-lactamase production in *Bacteroides* and *Fusobacterium*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*1990b; 1: 47-50.
8. Bae K-S, Baumgartner JC, Shearer TR, David LL. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origins. *J Endod* 1997; 23(10): 620-623.
9. Bang FB. A bacterial disease of *Limulus polyphemus*. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1956; 98: 325.
10. Baumgartner JC, Falkler WA Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod* 1991; 17: 380-383.
11. Baumgartner JC, Falkler WA Jr, Bernie RS, Susuki JB. Serum IgG reactive with oral microorganisms associated with infections of endodontic origin. *Oral Microbiol Immunol*1992; 7: 106-110.
12. Baumgartner JC, Falkler WA Jr, Beckerman T. Experimentally induced infection by oral anaerobic microorganisms in a mouse model. *Oral Microbiol Immunol*1992; 7: 253-256.
13. Baumgartner JC, Khemaleelakul SU, Xia T. Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod*. 2003; 29:794-7.
14. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae K, Xia T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic Infections. *J Endod* 1999; 25: 413-415.
15. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod* 2003; 29: 44-7.

16. Berg JO, Nord CE. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand J Dent Res* 1973; 81: 163-166.
17. Bergenholtz G, Crawford JJ. Endodontic microbiology. In: Walton RE & Torabinejad M, eds. *Principles and practice of endodontics*. 1<sup>st</sup> edn. Philadelphia, PA, USA: WB Saunders Co; 1989; 267-282.
18. Bernal LA, Guillot E, Paquet C, Mouton C.  $\beta$ -lactamase-producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiol Immunol* 1998; 13: 36-40.
19. Bianchini H, Fernandez Canjila L, Bantar C, Smayevsky J. Trends in antimicrobial resistance of the *Bacteroides fragilis* group: a 20-year study at a medical center in Buenos Aires. *Clin Infect Dis* 1997; 25 (Suppl. 2) S268-9.
20. Bogen G, Slots J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1999; 32(3): 204-210.
21. Boyanova L, Osmanliev D, Petrov D, Mitov I, Usunova I, Petrov S, Minchev TZ. Anaerobic cocci and their resistance patterns to penicillin, cefoxitin, clindamycin and metronidazole: a Bulgarian study. *Clin Microbiol Infectious*. 2000; 6:623-4.
22. CB Walker. Selected antimicrobial agents: mechanism of action, side effects and drug interactions. *Periodontol* 2000 1996; 10 12-28.
23. Chambers HF, Sande MA. Antimicrobial agents. In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE eds. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9<sup>th</sup> edn. USA: Mc Grow-Hill Companies 1995; 1032-1141.
24. Chan Y, Chan CH. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect*. 2003;36:105-10.

25. Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003; 36:500-8.
26. Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *Int Endod J* 2004; 37:579-87.
27. Chen LL, Yan J. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide activated bone resorption of osteoclasts by inducing IL-1, TNF, and PGE Acta Pharmacol Sin. 2001; 22:614-8.
28. Chu FC, Tsang CS, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space. *J Endod* 2005; 31:424-9.
29. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJC. Evaluation of the E-tet for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 2197-2203.
30. Conti R, Zelante F, Pignatari ACC, Mayer MPA. Phenotypic identification and antimicrobial susceptibility of black-pigmented bacteria. *Anaerobe* 1999; 5: 455-459.
31. Couroux PR, Massey VE, Schieven BC, Lannigan R, Hussain Z. Comparison of the E-test reference ágar dilution method for susceptibility of Gram-negative anaerobic organisms. *Clin Microbiol Infect dis* 1993; 100: 301-303.
32. Croco JL, Erwin ME, Jennings JM, Putnam LR, Jones RN. Evaluation of the E-test to determinations of antimicrobial spectrum and potency against anaerobes associated with bacterial vaginosis and peritonitis. *Clin Infect Dis* 1995; 20 (Suppl. 2) S339-41.

33. Cullmann W, Frei R, Krech T. Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. *Chemother* 1993; 39: 169-174.
34. Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. *J Dent Res* 1980; 59:1033-40.
35. Dahlén G, Hofstad T. Endotoxic activities of lipopolysaccharides of microorganisms isolated from an infected root canal in *Macaca cynomolgus*. *Scand J Dent Res* 1977; 85:272-8.
36. Dahlén G, Magnusson BC, Moller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. *Arch Oral Biol*. 1981; 26:591-8.
37. Dahlén G, Wikström M, Renvert S, Gmür R, Guggenheim B. Biochemical and serological characterization of *Bacteroides intermedius* strains isolated from the deep periodontal pocket. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 2269-2274.
38. Dahlén, G. Immune response in rats against lipopolysaccharides of *Fusobacterium nucleatum* and *Bacteroides oralis* administered in the root canal. *Scand J Dent Res* 1980; 88: 122–129
39. 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. Prevention of endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. *J Am Med Assoc* 1997; 277: 1794-1801.
40. Debelian, G. J., Olsen, I. & Tronstad, L. Bacteremia in conjunction with endodontic therapy. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 142–149.

41. Dougherty WJ, Bae K-S, Watkins BJ, Baumgartner JC. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *J Endod* 1998; 24: 356-358.
42. Drucker DB, Gomes BPFA, Lilley JD. Role of anaerobic species in endodontic infection. *Clin Infect Dis* 1997; 25 (suppl 2): S220-221.
43. Dubreuil L, Senneville E, Linez M. Criteres de choix dun antibiotique dans les infections parodontales. *J Parodont* 1995; 14: 64-74
44. Dubreuil L. Sensibilite aux antibiotiques des anaerobies stricts a l'exclusion des Bacteroides du groupe fragilis. *Rev Fr Lab* 1993; 256:85-9.
45. Duerden BI. Role of the reference laboratory in susceptibility testing of anaerobes and a survey of isolates referred from laboratories in England and Wales during 1993-1994. *Clin Infect Dis* 1995; 20(Suppl 2) S180-186.
46. Dwyer TG, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *J Endod* 1980; 7:31-5.
47. Farber PA, Seltzer S. Endodontic microbiology. 1. Etiology. *J Endod* 1988; 14: 363-371.
48. Ferrari PH, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections *Int Endod J* 2005; 38:372-80.
49. Foschi F, Cavrini F, Montebugnoli L, Stashenko P, Sambri V, Prati C. Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients. *Oral Microbiol Immunol* 2005; 20:289-95.

50. Friberger P, Knos M & Mellstam L. Endotoxins and their detection with the Limulus Amebocyte Test, 1982 pp. 195–206. New York: A. R. Liss.
51. Gatti JJ, Dobeck JM, Smith C, White RR, Socransky SS, Skobe Z. Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 197-204.
52. Gharbia S, Haapasalo M, Shah H, Kotiranta A, Lounatmaa K, Pearce M, Devine D. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol* 1994; 65: 56-61.
53. Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF. Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *J Endod* 1997; 23:419-22.
54. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* in endodontic lesions detected by culture and by PCR. *Oral Microbiol Immunol*. 2005; 20:211-5.
55. Gomes BPFA, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia* and *Treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod* 2006; 32 (10): 937-40.
56. 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;19:71-6.
57. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994a; 27: 291-298.

58. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Negative and positive associations between bacterial species in root canals. *Microbios* 1994b; 80: 231-243.
59. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996a;29:69-75.
60. Gomes BPFA, Lilley JD, Drucker DB. Clinical significance of dental root canal microflora. *J Dent* 1996b; 24: 47-55.
61. Gomes BPFA. An investigation into the root canal microflora. PhD thesis. University of Manchester, UK 1995.
62. Gomes BPFA. Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico. Piracicaba: Universidade de Campinas – UNICAMP. Tese de Livre-Docência, 2002.
63. Grad HA. Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan* 1997; 90: 64-72.
64. Griffie MB, Patterson SS, Miller CH, Kafrawy AH, Newton CW. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol Endod* 1980; 50: 457-461.
65. Greeffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal healthy status. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3239–3242.
66. Haapasalo M. *Bacteroides* spp. in dental root infections. *Endod Dent Traumatol* 1989;5: 1-10.
67. Handal T, Olsen I. Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases. *Eur J Oral Sci* 2000; 108: 163-174.

68. Hashimura T, Sato M, Hoshino E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium saphenum* from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. *Int Endod J* 2001; 34: 463-470.
69. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiva N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endod* 1992; 11: 558-561.
70. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H, Ozeki M. Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium*, and *Veillonella* isolated from infected root canals. *J Endod* 1989; 15: 530-4.
71. Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Corelations between endotoxin and clinical symptoms or radicular radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1991; 71:492-495.
72. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod* 1990;16: 331-4.
73. Horiba N, Maekawa Y, Yamauchi Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Complement activation by lipopolysaccharides purified from gram-negative bacteria isolated from infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod* 1992; 74:648-51.
74. Jacinto RC, Gomes BPF, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical

- periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:285-92.
75. Jiang J, Zuo J, Hurst IR, Holliday LS. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccharide on osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96: 738-43.
76. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices. *Clin Infect Dis* 1998;26: 973–80.
77. Jung II-Y, Choi B-K, Lee S-J, Lee C-Y, Park D-S. Molecular epidemiology and association of putative pathogens in root canal infection. *J Endod* 2000;26: 599-604.
78. 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 Oral Radiol and Endod* 1965; 20: 340-349.
79. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int Endod J* 2000; 33: 132-7.
80. Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in the vital pulp of human carious teeth: association with pulpal pain. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 587-93.
81. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94: 746-55.
82. Kleinfelder JW, Muller RF, Lange DE. Antibiotic susceptibility of putative periodontal pathogens in advanced periodontitis patients. *J Clin Periodontol* 1999; 26: 347-51.

83. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: Biofilms, interactions, and genetic systems. *Ann Rev Microbiol* 2000; 54: 413-437
84. Koonen E, Nyfors S, Matto J, Asikainen S, Jousimies-Somer H.  $\beta$ -lactamase production by oral pigmented *Prevotella* species isolated from young children. *Clin Infect Dis* 1997;25(Suppl 2): S272-274.
85. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 90: 600-608.
86. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Incidence of  $\beta$ -lactamase production and antimicrobial susceptibility of anaerobic Gram-negative rods isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 10-15.
87. Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriology and antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from pus specimens of orofacial odontogenic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2002; 17: 132-135.
88. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MAR, Farias LM. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 100 – 105.
89. Levin J, Bang FB. The role of endotoxin in the extracellular coagulation of *Limulus* blood. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 1964; 115: 265.

90. Levin J, Bang FB. A description of cellular coagulation in the *Limulus* blood. Bull Johns Hopkins Hosp. 1964; 115: 337.
91. Lewis MA, Pankhurst CL, Douglas CW, Martin MV, Absi EG, Bishop PB, Jones SA. Assessment of the Etest method for detection of penicillin resistance in acute suppurative oral infection. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 328-9.
92. Lewis MAO, Carmichael F, MacFarlane, Milligan SG. A randomised trial of co-amoxiclav (Augmentin) versus penicillin V in the treatment of acute dentoalveolar abscess. Brit Dent J 1993; 175: 169-174.
93. Makkar S, Nissan R, Wilkinson D, Sela M, Stevens R. *Porphyromonas endodontalis* and symptoms from teeth with endodontic infections. J Endod 1999; 29: 283.
94. Massey VE, Lannigan R, Hussain Z. Evaluation of susceptibility of anaerobic organisms by the E-test and the reference agar dilution method. Clin Infect Dis 1995; 20(Suppl 2):S337-338.
95. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. J Endod 1999; 25:795-9.
96. Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulske-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. J Endod 1987; 13: 559-65.
97. Miller WD. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. Dent Cosmos 1894; 36: 505-528.
98. Mc Gee JOD, Isaacson PG, Wright NA. Oxford testbook of pathology. Principles of pathology. Oxford: University Press, 1992. 895p

99. Moenning JE, Nelson CL, Kohler RB. The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. *J Oral Maxillofac Surg* 1989; 47:976-85.
100. Möller AJR, Fabricius L, Dahlen G, Öhman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 475-484.
101. Möller AJR. Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies. Göteborg, Sweden: Akademiförlaget 1966.
102. Moraes SR, Siqueira Jr JF, Colombo AP, Rôças IN, Ferreira MCS, Domingues RMCP. Comparison of the effectiveness of bacterial culture, 16S rDNA directed polymerase chain reaction, and checkerboard DNA-DNA hybridization for detection of *Fusobacterium nucleatum* in endodontic infections. *J Endod* 2002; 28: 86-89.
103. Morrison DC, Kline LF. Activation of the classical and properdin pathways of complement by bacterial lipopolysaccharides (LPS). *J Immunol* 1977; 118:362-8.
104. Morse DR. Microbiology and Pharmacology. In: Cohens S & Burns RC, eds. Pathways of the pulp. 4<sup>th</sup> edn. St Louis, MO, USA: CV Mosby Co. 1987.
105. Murakami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Yamamoto Y, Fujisawa SA. Possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16:321-5
106. Murray, C. A. & Saunders, W. P. Root canal treatment and general health: a review of the literature. *Int Endod J* 2000; 33: 1-18

107. Nachnani S, Scuteri A, Newman MG, Avanesian AB, Lomeli SL. E-test: a new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *J Periodontol* 1992; 63: 576-583.
108. Nakane A, Yoshida T, Nakata K, Horiba N, Nakamura H. Effects of lipopolysaccharides on human dental pulp cells. *J Endod* 1995; 21:128-30.
109. National committee for clinical laboratory standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 4<sup>th</sup> edn. Approved standard. NCCLS document M11-A4. Villanova, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
110. Nisengard JR, Newman MG. *Microbiologia oral e imunologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2<sup>a</sup> ed. 1997: 395.
111. Oliveira JCM, Siqueira JF Jr, Alves GB, Hirata R Jr, Andrade AF. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *J Endod* 2000; 26: 729-732.
112. Pajukanta R, Asikainen S, Forsblom B, Piekkola M, Jousimies-Somer H. Evaluation of the E-test for antimicrobial susceptibility testing of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 1994; 9:123-5.
113. Pelt P, Zimmermann B, Ulbrich N, Bernimoulin JP. Effects of lipopolysaccharide extracted from *Prevotella intermedia* on bone formation and on the release of osteolytic mediators by fetal mouse osteoblasts in vitro. *Arch Oral Biol* 2002; 47: 859-66.
114. Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J* 2002; 35: 698-702.

115. Pinero GJ, Kiatpongsah S, Hutchins MO, Hoover J. The effect of endotoxin on the synthesis of connective tissue matrix components by pulp fibroblasts in vitro. *J Endod* 1983; 9: 2-7.
116. 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* 2003; 18:100-3.
117. Pitts DL, Williams BL, Morton TH Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation *J Endod* 1982; 8:10-8.
118. Poulet PP, Duffaut D, Lodter JP. Evaluation of the E-test for determining the in-vitro susceptibilities of *Prevotella intermedia* isolates to metronidazole. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 610-611.
119. R Woods. The changing nature of pyogenic dental infections. *Aus Dent J* 1981; 26: 209-213.
120. R Woods. A guide to the use of drugs in dentistry (10th ed ed.), Australian Dental Association Inc, Sydney (Australia) 1985.
121. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Sci Am.* 1992; 267: 54-61.
122. Roache Y, Yoshinori RN. In vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 353-357.
123. Roças IN, Siqueira JF Jr, Andrade AF, Uzeda M. Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR. *Int Endod J* 2003; 36:20-6.

124. Roças IN, Siqueira JF Jr. Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 15: 279-85.
125. Rosenblatt JE, Brook I. Clinical relevance of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clin Infect Dis* 1993;16 (Supplement 4), S446-448.
126. Rosenblatt JE, Gustafson DR. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diag Microbiol Infect Dis* 1995; 22: 279-284.
127. Sabeti M, Simon JH, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus are associated with symptomatic periapical pathosis. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:327-8.
128. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:112-22.
129. Sandor G.K., Low D.E., Judd P.L., Davidson R.J. Antimicrobial treatment options in the management of odontogenic infections. *J Canad Dent Assoc* 1998; 64: 508–514.
130. Sassone L. Microbiota de infecções endodônticas primárias e sua relação com aspectos clínicos e radiográficos, 2005. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, UERJ, Brasil.
131. Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod* 1975; 1:19-21.

132. Schonfeld SE, Greening AB, Glick DH, Frank AL, Simon JH, Herles SM. Endotoxic activity in periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982; 53(1):82-7.
133. Seltzer S, Farber PA. Microbiologic factors in endodontology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1994; 78: 634-645.
134. Shah HN, Gharbia SE. Biochemical and chemical analyses of black-pigmented Gram-negative anaerobes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993; 6: 89-96.
135. Simon, B. I., Goldman, H. M., Ruben, M. P. & Baker, E. The role of endotoxin in periodontal disease. Correlation of the amount of endotoxin in human gingival exudate with the histologic degree of inflammation. *J Periodontol* 1971; 42: 210–216.
136. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Oliveira JC, Santos KR. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 2001; 27:563-6.
137. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:363-70.
138. Siqueira JF Jr, Rocas IN. *Campylobacter gracilis* and *Campylobacter rectus* in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2003; 36:174-80.
139. Siqueira JF, Rocas IN. Positive and negative bacterial associations involving *Dialister pneumosintes* in primary endodontic infections. *J Endod* 2003; 29: 438-41.
140. Siqueira Jr JF, Roças IN, Favieri A, Oliveira JCM, Santos KRN. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *Int Endod J* 2001b; 34: 280-284.

141. Siqueira Jr JF, Roças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 2001a; 27: 563-566.
142. Siqueira Jr JF, Roças IN, Souto R, Uzeda M, Colombo AP. Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000; 89: 744-748.
143. Slots J. Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescence assay for trypsin-like activity. *Oral Microbiol Immunol* 1987; 2: 139-141.
144. Sousa EL, Ferraz CC, Gomes BP, Pinheiro ET, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. Bacteriological study of root canals associated with periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003 ; 96 :332-9.
145. Solum NO. Some characteristics of the clottable protein of *Limulus polyphemus* blood cells. *Thromb Diath Haemorrh* 1970; 23: 170.
146. Spangler SK, Jacobs MR, Appelbaum PC. Susceptibilities of 201 anaerobes to erythromycin, azithromycin, clarithromycin and roxithromycin by oxyrase ágar dilution and E-test methodologies. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1366-1367.
147. Stubbs S, Park SF, Bishop PA, Lewis MAO. Direction of *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens* in suppurative oral infection by amplification of 16S rRNA gene. *J Med Microbiol* 1999; 48: 1017-1022.
148. Sundqvist G, Johansson E, Sjogren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *J Endod* 1989; 15: 13-19.
149. Sundqvist G. Bacteriologic studies of necrotic dental pulps. *Odontological Dissertation n° 7. University of Umea, Sweden* 1976.

150. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7: 257-262
151. Sundqvist G. Pathogenicity and virulence of black-pigmented Gram-negative anaerobes. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993; 6: 125-138.
152. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1994; 78: 522-530.
153. Syed AS, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Appl Microbiol* 1972; 24: 638-644.
154. Tamaka-bandon K, Kato N, Watanabe K, Ueno K (1995) Antibiotic-susceptibility profiles of *Bacteroides fragilis* and *Bacteroides thetaiotaomicron* in Japan from 1990 to 1992. *Clin Infect Dis* 20 (Suppl. 2), 352–5.
155. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiologia*. 6<sup>th</sup> ed Porto Alegre (RS Brasil): Artes Médicas Sul 2000
156. Vafaie NM, Dobeck JM, Warbington ML, Dibart S, Harris M, Skobe Z. DNA analysis of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth. *J Endod* 1999; 25: 290.
157. van Winkelhoff AJ, Carlee AW, Graaff J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infect Immun* 1985; 49: 494-497.
158. van Winkelhoff AJ, Herrera D, Oteo A, Sanz M. Antimicrobial profiles of periodontal pathogens isolated from periodontitis patients in The Netherlands and Spain. *J Clin Periodontol* 2005; 32:891-2.

159. van Winkelhoff AJ, van Steenbergem TJM, Graaff J. *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis*: Its role in endodontal infections. J Endod 1992; 18:431-434.
160. van-Steenbergen TJM, Kastelein P, Touw JJA, De Graaff J. Virulence of black pigmented *Bacteroides* strains from periodontal pockets and other sites of experimentally induced skin lesions in mice. J Periodont Res 1982; 17: 41-49.
161. van-Steenbergen TJM, van-Winkelhoff AJ, Graaff J, Duerden BI. Antibiotic susceptibilities of black-pigmented Gram-negative anaerobes. Immunol Med Microbiol 1993; 6: 229-234.
162. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2005; 20: 253-8.
163. Vigil GV, Wayman BE, Dazey SE, Fowler CB, Bradley DV Jr. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. J Endod 1997; 23:110-114.
164. Villanueva LECP. *Fusobacterium nucleatum* in endodontic flare-ups. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 93:179-183.
165. Warfvinge J, Dahlen G, Bergenholtz G. Dental pulp response to bacterial cell wall material. J Dent Res 1985; 64:1046-50.
166. Wesselink PR, Thoden van Velzen SK, Makkes PC. Release of endotoxin in an experimental model simulating the dental root canal. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1978; 45:789-95.
167. Westphal O. Bacterial endotoxins. The second Carl Prausnitz Memorial Lecture. Int Arch Allerg Appl Immunol 1975; 49(1-2):1-43.

168. Wust J, Hardegger U. Comparison of the E-test and a reference ágar dilution method for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11; 1169-1173.
169. Xia T, Baumgartner JC, David LL. Isolation and identification of *Prevotella tanneriae* from endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15: 273-275.
170. Yamamoto K, Fukushima H, Tsuchiya H, Sagawa H. Antimicrobial susceptibilities of *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, and *Bacteroides* isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 1989; 15:112-116.
171. Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod* 1992; 8:501-4.
172. Yoshida M, Fukushima H, Yamamoto K, Ogawa K, Toda T, Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canal of teeth with periapical pathosis. *J Endod* 1987; 13: 24-28.
- 173.** Young NS, Levin J, Prendergast RA. An invertebrate coagulation system activated by endotoxin: Evidence for enzymatic mechanism. *J Clin Invest* 1972; 51: 1790.

## 9- Anexo

### 1. Aspectos clínicos e microbiológicos dos pacientes do estudo.

paciente	Aspectos clínicos	microrganismos
1	25 anos; sexo F; D 22; Dor espontânea; Dor percussão; Dor à palpação; exsudato claro; restauração definitiva; microinfiltração; abscesso.	<i>P. buccae</i> , <i>P. micros</i> , <i>F. necrophorum</i> , <i>Veillonella</i> spp.
2	18 anos; sexo F; D 22; Assintomático; seco; Fístula; restauração definitiva; microinfiltração; abscesso.	<i>F. nucleatum</i> , <i>A. meyeri</i> , <i>G. morbillorum</i>
3	25 anos; sexo F; D 23; Dor espontânea; Dor percussão; Dor à palpação; seco; restauração provisória; cariado; abscesso.	<i>P. buccae</i> , <i>Veillonella</i> spp.
4	20 anos; sexo M; D 21; Dor espontânea; Dor percussão; seco; restauração definitiva; cariado; microinfiltração	<i>P. oralis</i> , <i>E. limosum</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>B. adolescentis</i>
5	38 anos; sexo F; D 12; dor prévia, Dor espontânea; Dor percussão; Dor à palpação; Edema; exsudato purulento; cariado; abscesso.	<i>P. intermedia</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. asaccharolyticus</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Bifidobacterium</i> spp.
6	28 anos; sexo F; D 44; Dor espontânea; Dor à percussão, dor à palpação, seco; cariado; abscesso.	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>B. ureolyticus</i> , <i>E. lenta</i> , <i>E. limosum</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>G.morbillorum</i>
7	34 anos; sexo F, D 22; Dor espontânea; Dor à percussão, Dor à palpação, Edema, seco, cariado, restauração definitiva, microinfiltração, abscesso	<i>B. gracilis</i> , <i>E. lenta</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>P. acnes</i> , <i>G. morbillorum</i>
8	33 anos; sexo F, D 12; Assintomático; seco; restauração definitiva, microinfiltração	<i>P. oralis</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>P. acnes</i> , <i>H. haemolyticus</i> , <i>Micrococcus</i> spp.
9	52 anos; sexo F; D 16; dor prévia, Dor espontânea; Dor percussão; Dor à palpação; Edema; exsudato purulento; cariado; abscesso.	<i>F. nucleatum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>L. acidophylus</i>
10	22 anos; sexo F; D 37; dor prévia, Dor espontânea; Dor percussão; Dor à palpação; exsudato hemorrágico; cariado; abscesso.	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>A. odontolyticus</i> , <i>P. propionicum</i> , <i>P. granulosum</i> , <i>A. viridans</i> , <i>Neisseria</i> spp.
11	21 anos; sexo M; D 17; dor prévia, Dor espontânea; Dor percussão; Dor à palpação; Edema;seco; restauração provisória; microinfiltração; abscesso.	<i>A. meyeri</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>Veillonella</i> spp.; <i>G. morbillorum</i>
12	64 anos; sexo M; D 24; Dor espontânea; Dor percussão; Dor à palpação; Edema; seco; hígido; abscesso.	<i>P. gingivalis</i> , <i>P. oralis</i> , <i>P. loescheii</i> , <i>E. limosum</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Veillonella</i> spp.
13	15 anos; sexo M; D 46; Dor espontânea; Dor percussão; Dor à palpação; seco; cariado; abscesso.	<i>P. intermedia</i> , <i>P. buccae</i> , <i>P. magnus</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>A. odontolyticus</i> , <i>Clostridium</i> spp.
14	27 anos; sexo M; D 35; Dor espontânea; dor prévia; Dor percussão; exsudato purulento; cariado; abscesso.	<i>P. intermedia</i> , <i>P. oralis</i> , <i>A. prevotii</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>L. acidophylus</i> , <i>P. propionicum</i>
15	10 anos; sexo F; D 36; Dor espontânea; Dor percussão; edema; dor palpação; exsudato purulento; cariado; abscesso.	<i>P. intermedia</i> , <i>P. oralis</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>L. acidophylus</i> , <i>G. morbillorum</i>

## 1-spectos clínicos e microbiológicos dos pacientes do estudo. (continuação)

16	30 anos; sexo F; D 11; Dor espontânea; Dor percussão; dor palpação; seco; restauração definitiva; microinfiltração; abscesso.	<i>P. melaninogenica, F. nucleatum, Veillonella spp.</i> ,
17	37 anos; sexo F; D 35; Dor espontânea; Dor percussão; dor palpação; edema; seco; restauração definitiva; cariado; abscesso.	<i>P. gingivalis, P. buccae, A. Prevotii, E. Limosum, F. Nucleatum,</i>
18	31 anos; sexo M; D 12; Dor espontânea; Dor percussão; dor palpação; edema; restauração definitiva; microinfiltração; exsudato purulento; abscesso.	<i>P. gingivalis, P. loescheii, Eubacterium spp., F. nucleatum, A. viscosus, C. butyricum, G. morbillorum</i>
19	43 anos; sexo F; D 24; Dor espontânea; Dor percussão; dor palpação; cariado; seco; abscesso.	<i>P. oralis, E. lenta, F. nucleatum, Bifidobacterium spp., Veillonella spp., Streptococcus spp.</i>
20	36 anos; sexo F; D 48; Dor espontânea; Dor percussão; dor palpação; restauração definitiva; microinfiltração; seco; abscesso.	<i>P. gingivalis, P. oralis, A. prevotii, C. sporogens, Streptococcus spp.</i>
21	29 anos; sexo F; D 44; Dor espontânea; Dor percussão; edema; dor palpação; cariado; exsudato purulento, abscesso.	<i>P. intermedia, P. oralis, P. micros, A. prevotii, E. lenta, F. nucleatum, C. botulinum</i>
22	23 anos; sexo F; D 24; dor prévia; Dor percussão; restauração definitiva; cariado; seco, abscesso.	<i>B. ureolyticus, Clostridium spp.</i>
23	31 anos; sexo F; D 22; dor espontânea, Dor percussão; dor a palpação, hígido, seco, abscesso.	<i>B. ureolyticus, P. micros, S. constellatus, Capnocytophaga spp.</i>
24	27 anos; sexo M; D 27; dor espontânea, restauração provisória, cariado, exsudato purulento, abscesso.	<i>P. intermedia, P. buccae, Peptostreptococcus spp., F. nucleatum, Bifidobacterium spp., G. morbillorum,</i>
25	56 anos; sexo F; D 44; assintomático, Restauração definitiva, cariado, exudato hemorrágico	<i>P. intermedia, P. denticola, P. oralis, P. asaccharolyticus, F. nucleatum, C. sporogens, C. botulinum, L. acidophylum,</i>
26	30 anos; sexo F; D 23; assintomático, Restauração definitiva, microinfiltração, exudato claro, Fístula, abscesso	<i>P. propionicum</i>
27	63 anos; sexo F; D 44; dor espontânea, dor a percussão, edema, dor a palpação, cariado, exudato purulento, abscesso	<i>P. intermedia, P. buccae, F. nucleatum, C. acetobutyricum, Actinomyces spp.</i>
28	30 anos; sexo F; D 22; assintomático, restauração provisória, seco,	<i>A.meyeri, P. propionicum, P. acnes, G. morbillorum</i>
29	39 anos; sexo F; D 11; assintomático, restauração provisória, seco,	<i>E. lenta, F. nucleatum, A. odontolyticus, P. propionicum, G. morbillorum</i>
30	20 anos; sexo F; D 12; assintomático, restauração provisória, seco,	<i>A.naeslundii, A.viscosus, S. mitis, G. morbillorum</i>
31	44 anos; sexo M; D 23; Dor espontânea; dor prévia; edema; dor palpação; cariado; seco, Fistula, abscesso.	<i>P. gingivalis, P. intermedia, P. oralis, P. corporis, P. anaerobius, A. prevotii, F. necrophorum, Clostridium spp.</i>
32	53 anos; sexo F; D 46; Dor espontânea; dor prévia; dor a percussão; Restauração definitiva, microinfiltração, seco	<i>P. oralis, P. buccae, P. corporis, B. fragilis, G. morbillorum</i>

## 1. Aspectos clínicos e microbiológicos dos pacientes do estudo. (continuação)

33	20 anos; sexo F; D 46; Dor espontânea; dor a percussão; cariado, microinfiltração, seco.	<i>A.odontolyticus, S. constellatus, S. mitis, G. morbillorum</i>
34	63 anos; sexo F; D 34; Dor espontânea; dor prévia; dor a percussão; edema; Restauração definitiva, cariado, exudato purulento, abscesso.	<i>A. prevotii, F. nucleatum, F. necrophorum, S. oralis, Staphylococcus spp.</i>
35	63 anos; sexo F; D 34; Dor espontânea; dor prévia; dor a percussão; edema; dor a palpação; Restauração provisória, microinfiltração; exudato purulento, abscesso.	<i>A. prevotii, F. necrophorum, A..odontolyticus, Veillonella spp., S. oralis, S. sanguis</i>
36	29 anos; sexo F; D 31; Dor espontânea; dor prévia; cariado; seco;	<i>B. gracilis, E. Lenta, Bifidobacterium spp., A. Odontolyticus, A. Viscosus, Clostridium spp., Veillonella spp.</i>
37	17 anos; sexo M; D 21; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, exsudato hemorrágico	<i>P. intermedia, E. lenta, F. nucleatum, F. necrophorum, Clostridium spp.</i>
38	46 anos; sexo F; D 13; restauração, cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema; seco	<i>A. prevotii, F. necrophorum, Clostridium spp., Neisseria spp.</i>
39	37 anos; sexo F; D 45; cariado; Dor espontânea, dor prévia; seco	<i>P corporis, E. lenta, T. praecuta</i>
40	30 anos; sexo M; D 15; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, exsudato purulento	<i>P. micros, A. prevotii, S. constellatus, E. faecalis, G. morbillorum</i>
41	17 anos; sexo M; D 24; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>P. intermédia, P. corporis, P. anaerobius, A. prevotii, Clostridium spp., Staphylococcus spp.</i>
42	40 anos; sexo F; D 11; restauração definitiva; microinfiltração; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, edema, fistula; seco	<i>P. micros, E. lenta, F. necrophorum, Staphylococcus spp.</i>
43	24 anos; sexo F; D 21; restauração provisória; microinfiltração Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>P. bivia, P. melaninogenica, B. fragilis, P. micros, A. prevotii, Clostridium spp., S. sanguis, G. morbillorum, T. praecuta</i>
44	41 anos; sexo M; D 41; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema; seco	<i>P. micros, F. nucleatum, Veillonella spp., S. constellatus, S. mitis, G. morbillorum, Staphylococcus spp.</i>
45	22 anos; sexo F; D 42; caridado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão; seco	<i>B. gracilis, A. Prevotii, F. necrophorum, Bifidobacterium spp.</i>
46	29 anos; sexo M; D 12; restauração definitiva; microinfiltração Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>P. gingivalis, P. micros, E. limosum, Veillonella spp., S. sanguis</i>
47	18 anos; sexo M; D 22; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão; seco	<i>P. intermedia, P. micros, P. anaerobius, F. nucleatum, Staphylococcus spp.</i>
48	46 anos; sexo F; D 11; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão; seco	<i>P. corporis, B. gracilis, P. anaerobius, G. morbillorum</i>
49	30 anos; sexo M; D 11; restauração definitiva; microinfiltração Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato hemorrágico	<i>F. nucleatum, F. necrophorum</i>
50	28 anos; sexo F; D 11; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato hemorrágico	<i>P. intermedia, P. micros, F. nucleatum, F. necrophorum, A. odotolyticus, E. faecium</i>

### Aspectos clínicos e microbiológicos dos pacientes do estudo (continuação)

51	30 anos; sexo F; D 21; restauração definitiva; microinfiltração Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>P. melaninogenica, P. prevotii, S. constellatus</i>
52	28 anos; sexo F; D 21; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato hemorrágico	<i>P. intermedia, P. micros, F. necrophorum, F. varium</i>
53	28 anos; sexo M; D 12; restauração definitiva; microinfiltração Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>P. buccae, P. Micros, F. nucleatum, B. adolescentis, G. morbillorum, S. anginosus</i>
54	16 anos; sexo F; D 12; hígido; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão; seco	<i>P. oralis, B. adolescentis, Veillonella spp., S. sanguis</i>
55	33 anos; sexo M; D 12; cariado; Dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação; seco	<i>P. denticola, P. loescheii, A.meyeri, Veillonella spp., S. Constellatus, E. faecalis, G. morbillorum</i>
56	27 anos; sexo F; D 22; restauração definitiva; microinfiltração; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>B. fragilis, E. lenta, Veillonella spp., S. mitis, T. Praecuta</i>
57	16 anos; sexo M; D 11; restauração definitiva; microinfiltração; Dor espontânea, dor à percussão, exsudato claro	<i>P. oralis, B. gracilis, F. nucleatum, Clostridium spp., G. haemolysans</i>
58	20 anos; sexo M; D 35; caridado; Dor espontânea, exsudato hemorrágico	<i>P. intermedia, P. oralis, B. adolescentis, A. israelii, A. viscosus, L. acidophylus, P. acnes</i>
59	33 anos; sexo F; D 45; cariado; Dor espontânea, dor à palpação, edema; seco	<i>P. intermedia, P. loescheii, P. micros, F. nucleatum, A. odontolyticus</i>
60	32 anos; sexo F; D 24; restauração definitiva; microinfiltração Assintomático, dor prévia; seco	<i>B. breve, A. odontolyticus, A.meyeri, S. oralis, Haemophilus spp.</i>
61	26 anos; sexo F; D 22; restauração definitiva; cariado; microinfiltração Assintomático; seco	<i>S. sanguis, Staphylococcus spp.</i>
62	61 anos; sexo M; D12; cariado; Assintomático, dor prévia; seco	<i>A. prevotii, F. necrophorum, S. mitis</i>
63	19 anos; sexo M; D 21; cariado; Assintomático, dor previa, exudato claro	<i>P. intermedia, P. corporis, P. micros, A. prevotii</i>
64	16 anos; sexo F; D 36; restauração definitiva; microinfiltração Assintomático; seco	<i>Veillonella spp., S.sanguis, S. mitis</i>
65	22 anos; sexo M; D 11; restauração definitiva; microinfiltração Dor previa, Dor à percussão ; seco	<i>A. prevotii, P. asacharolyticus, S. sanguis</i>
66	18 anos; sexo M; D 31; restauração definitiva; microinfiltração Assintomático, exudato hemorrágico	<i>A.odontolyticus, S.sanguis</i>
67	30 anos; sexo F; D 44; cariado; Dor à percussão; seco	<i>P. oralis, P. loescheii, F. necrophorum, E. faecalis, Staphylococcus spp.</i>
68	19 anos; sexo F; D 26; restauração definitiva; microinfiltração; dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento, fistula	<i>Clostridium spp., S. oralis, S. sanguis, S.anginosus</i>
69	39 anos; sexo F; D 41; restauração definitiva; microinfiltração; dor prévia, dor à percussão, exsudato purulento, fístula	<i>S. sanguis, S. mitis, S. constellatus, Staphylococcus spp.</i>
70	19 anos; sexo F; D 45; cariado; dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema; seco	<i>P. anaerobius, A. prevotii, F. necrophorum, S. constellatus, G. morbillorum</i>

71	28 anos; sexo M; D 46; restauração definitiva; microinfiltração dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento, fístula	<i>P. gingivalis, P. denticola, P. micros, F. nucleatum, P. acnes, S. anginosus</i>
72	30 anos; sexo F; D 24; restauração definitiva; microinfiltração dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>P. gingivalis, F. nucleatum, Veillonella spp., S. constellatus</i>
73	29 anos; sexo F; D 21; restauração definitiva; microinfiltração dor prévia, dor à percussão, exsudato purulento, fístula	<i>F. necrophorum, Clostridium spp., Staphylococcus spp.</i>
74	19 anos; sexo F; D 31; cariado; dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, exsudato claro, fístula	<i>P. intermedia, A. prevotii, S. sanguis, S. constellatus</i>
75	24 anos; sexo F; D 11; restauração definitiva; microinfiltração Dor à palpação; seco	<i>E. lenta, F. necrophorum, Bifidobacterium spp., S. mutans</i>
76	57 anos; sexo F; D 13; restauração definitiva; microinfiltração Assintomático; seco	<i>P. micros</i>
77	30 anos; sexo F; D 12; cariado; Assintomático	-
78	47 anos; sexo F; D 42; cariado; Dor prévia, dor palpação; seco	<i>E. limosum, B. adolescentis, A. meyeri, L. acidophylus, Veillonella spp., G. Morbillorum</i>
79	48 anos; sexo F; D 34; restauração definitiva; microinfiltração; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>P. intermedia, P. oralis, E. lenta, Bifidobacterium spp., Clostridium spp., G. morbillorum</i>
80	48 anos; sexo F; D 31; hígido; microinfiltração Assintomático; seco	<i>G. morbillorum, Haemophylus spp.</i>
81	20 anos; sexo F; D 45; cariado; Dor espontânea, dor prévia, dor à percussão, dor à palpação, edema, exsudato purulento	<i>P. intermedia, P. oralis, B. fragilis, A. prevotii, F. nucleatum</i>
82	55 anos; sexo F; D 31; hígido; Assintomático; seco	<i>P. propionicum</i>
83	38 anos; sexo F; D 25; restauração definitiva; microinfiltração Assintomático; seco	<i>E. limosum, F. nucleatum</i>
84	25 anos; sexo M; D 22; restauração provisória; microinfiltração; Assintomático; seco	<i>E. faecalis</i>
85	33 anos; sexo M; D 12; hígido; dor à percussão, dor à palpação, exsudato purulento; seco	<i>P. gingivalis, P. micros, F. nucleatum</i>
86	55 anos; sexo M; D 22; restauração definitiva; microinfiltração; Assintomático; seco	<i>P. gingivalis, P. oralis, F. nucleatum</i>
87	20 anos; sexo M; D 32; hígido; Assintomático; seco	<i>P. acnes</i>
88	20 anos; sexo M; D 31; hígido; Assintomático; seco	<i>F. nucleatum, P. propionicum</i>
89	20 anos; sexo M; D 41; hígido; Assintomático; seco	<i>P. propionicum</i>
90	29 anos; sexo F; D 25; cariado; Assintomático; seco	<i>P. intermedia, P. micros, F. nucleatum, A. meyeri</i>



UNICAMP

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

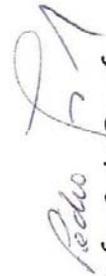


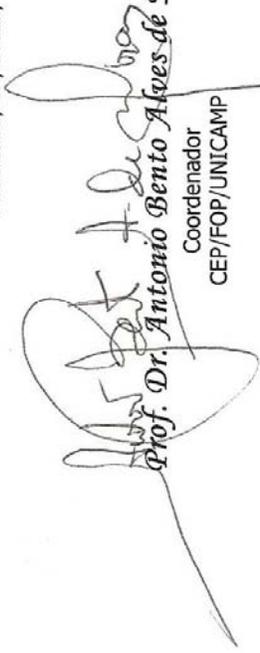
Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Análise microbiológica dos canais radiculares infectados de dentes com sintomatologia dolorosa", sob o protocolo nº **052/2001**, do Pesquisador **Rogério de Castilho Jacinto**, sob a responsabilidade da Profa. Dra. **Brenda Paula Figueiredo de Almeida 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, 24 de setembro de 2001

We certify that the research project with title "Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic teeth", protocol nº **052/2001**, by Researcher **Rogério de Castilho Jacinto**, responsibility by Prof. Dr. **Brenda Paula Figueiredo de Almeida 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, September 24 2001

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

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

### 3- Meio de Transporte

RTF – Reduced Transport Fluid \*

#### Descrição

É um meio não seletivo de transporte e estocagem. Com exceção de 0,02% de dithiothreitol (DTT), que é adicionado ao meio como um agente redutor, não há nenhum outro componente que propicie o crescimento bacteriano. A adição de uma pequena concentração de EDTA (0,1M) ao RTF promove uma distribuição mais uniforme das células bacterianas. Como EDTA atua como um agente quelante, sua incorporação ao RTF é útil por se ligar a cátions bivalentes, como  $\text{Ca}^{+2}$ , que estão presentes em altas concentrações na placa e contribuem para a agregação da placa bacteriana.

RTF não contém agentes bacteriostáticos que poderiam afetar a multiplicação de bactérias na amostra. Conseqüentemente, crescimento pode ocorrer neste meio, se a amostra contiver nutrientes que permitam a multiplicação por período limitado. Contudo, não foi comprovado crescimento de microrganismos da placa neste meio. Embora sua eficiência como um meio de estoque varia de acordo com a natureza da amostra, o desempenho do RTF é melhor do que outros meios já testados. A suplementação do meio com Dithiothreitol (DTT) o torna mais resistente à oxidação em condições de aerobiose. A viabilidade dos organismos pode ser mantida neste meio quando congelado. A adição de Resazurin ao RTF indica se houve ou não oxidação durante o experimento.

\*Syed AS, Loesche WJ. Survival of human dental plaque flora in various transport media. Appl Microbiol 1972; 24: 638-644.

#### Fórmula

Solução 1 (Estoque)

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,6g
$\text{H}_2\text{O}$	100mL

Solução 2 (Estoque)

NaCl	1,2g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,6g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,2g
Mg SO <sub>4</sub>	0,25g
H <sub>2</sub> O	100mL

**RTF** 100mL

Solução 1	7,5mL
Solução 2	7,5mL
EDTA 0,1M (0,3722g/10mL)	1mL
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 8% (0,4g/5mL)	0,5mL
Dithiothreitol 1% (0,05g/5mL)	2mL
Resazurin 0,1% (0,01g/10ml)	0,1mL
H <sub>2</sub> O	81,4mL

pH: 7 ± 0,2

## MEIOS DE CULTURA

### Fastidious Anaerobe Ágar (FAA) – LAB M (Bury, UK)

#### Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes desintoxicantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” produtores de pigmento preto. Agentes específicos de estimulação de crescimento: cisteína para *Fusobacterium* spp, *Propionibacterium acnes*, e *Bacteróides fragilis*; arginina para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*. Piruvato contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia. Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também

0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e álcoois que podem inibir o crescimento bacteriano.

### **Preparo**

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

### **Armazenagem do meio preparado**

Placas: até 7 dias a 4 °C fora do alcance da luz.

### **Incubação**

37 °C anaerobicamente (80% H<sub>2</sub>, 10% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> , por períodos de 48 horas e 7 dias).

<b>Fórmula</b>	<b>g/L</b>
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido solúvel	1,0
Ágar nº 2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
HCL cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5
-----	
pH: 7,4 ± 0,2	

Este meio pode ser enriquecido através da adição de Vitamina K<sub>1</sub> e Hemina:

- **Solução Vitamina K<sub>1</sub> (1 mg/mL)** - Sigma-Aldrich, USA.

**Preparo:**

Pese 0,1 g de Vitamina K<sub>1</sub> e adicione a um tubo contendo 100 mL de etanol absoluto. Armazene o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Para usar como suplemento para o meio de cultura adicione 1 µL/mL.

- **Solução de Hemina (5 mg/mL)** - Sigma-Aldrich, USA.

**Preparo:**

Dissolva 0,5 g de Hemina em 10 mL de Hidróxido de sódio (1N). Complete com água destilada até atingir 100 mL. Autoclave a 121°C por 15 minutos. Para usar como suplemento para o meio de cultura adicione 1 µL/mL.

Este meio pode se tornar seletivo para várias espécies de anaeróbios através da adição do antibiótico apropriado:

- **FAA (Fastidious Anaerobe Ágar)+ NAL (ácido nalidíxico-X 091)** – LAB-M, Bury-UK

Meio seletivo para anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos.

**Preparo**

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro, utiliza-se um vidro de ácido nalidíxico (X091) (5 mg), previamente diluído em 5 mL de água destilada, adicionando-o assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final: Ácido nalidíxico=0,01mg/mL

- **FAA + NAL+ VAN (Vancomicina-X090)**- LAB-M, Bury-UK

Meio seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

**Preparo**

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro, utiliza-se um vidro de ácido nalidíxico (X091) (5mg) e um vidro de vancomicina (X090)

(1,25 mg), previamente diluídos em 5mL de água destilada, em seguida as misturas são adicionadas assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final:

Ácido nalidixico=0,01mg/mL

Vancomicina=0,0025mg/mL

➤ **FAA + NEO (neomicina-X015)- LAB-M, Bury-UK**

Meio seletivo para clostrídios e outros anaeróbios, como *Bacteroides fragilis* e alguns cocos anaeróbios.

**Preparo**

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue de carneiro, utiliza-se um vidro de neomicina (37,5 mg) que é previamente diluído em 5mL de água destilada. Em seguida a mistura é adicionada assepticamente ao meio estéril e resfriado a 47°C.

Concentração final: neomicina=0,075mg/mL

➤ **FAA + VAN(X090) + KAN (Kanamicina-X018) – LAB-M, Bury-UK.**

Meio seletivo para anaeróbios Gram-negativos, particularmente bactérias produtoras de pigmento negro.

**Preparo**

Para 500mL de água deionizado + FAA (g) + 5% de sangue de desfibrinado de carneiro, um vidro de vancomicina (X090) (1,25 mg) e um vidro de Kanamicina (X018) (37,5 mg) que são previamente diluídos em 5mL de água destilada. Em seguida as misturas são adicionadas assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final: Vancomicina =0,0025mg/mL; Kanamicina=0,075mg/mL

➤ **FAA + SUPLEMENTO ANAERÓBICO G-N**

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

Suplemento seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

Cada vidro é suficiente para suplementar 500mL de meio.

## Composição

---

Hemina	2,50mg
Menadiona	0,25mg
Succinato sódico	1,23mg
Ácido nalidíxico	5,0mg
Vancomicina	1,25mg

---

## Preparo

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

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

### 3.2.1. Descrição

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

### Preparo

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

### Armazenagem

Em tubos com tampas, até 3 meses a 15-20°C fora do alcance da luz.

### Incubação

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

### 3.2.7. Fórmula

g/L

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

pH: 7,4 ± 0,2

### **Brain Heart Infusion Ágar (BHI) – LAB M (Bury, UK)**

#### **Descrição**

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose, mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações hemolíticas porque contém glicose em sua composição.

#### **Preparo**

Adicionar 24.5 g do pó em 500 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47 °C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de petri.

#### **Armazenagem**

Placas: até 7 dias a 4°C no escuro.

#### **Incubação**

Tempo e temperatura para cada microrganismo.

#### **Fórmula**

g/L

Infusão de sólidos de cérebro e coração	17,5
---	------

Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5
Ágar nº 2	12,0

pH: 7,4 ± 0,2

### **Brain Heart Infusion Broth (BHI) – LAB M (Bury, UK)**

#### **Descrição**

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e peptonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido à produção de ácido.

#### **Preparo**

Dispensar 18,5 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ficar em repouso por 10 minutos, sendo a seguir dissolvida sob aquecimento brando, antes de ser dispensada em tubos que são deixados semiabertos durante a esterilização. A esterilização é feita por autoclavagem a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a autoclavagem.

#### **Armazenagem**

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

#### **Incubação**

37 °C aerobically até 15 dias.

<b>Fórmula</b>	<b>g/L</b>
Infusão de sólidos de cérebro de boi	12,5
Infusão de sólidos de coração	5,0
Proteose peptona	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de sódio	5,0
Fosfato di-sódico	2,5

pH: 7,4 ± 0,2

## **Brucella Medium Base (OXOID, Hampshire-UK)**

### **Descrição**

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

### **Preparo**

Misturar 22,5g do pó a 500mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 minutos e depois agitada. Autoclavagem a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C. Adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, 500uL de Hemina e menadiona preparados previamente. Misturar bem e distribuir em placas de petri estéreis.

### **Armazenagem**

Placas: até 7 dias a 4°C fora do alcance da luz.

### **Incubação**

A 37°C anaerobicamente em atmosfera de 80% H<sub>2</sub>, 10% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, por períodos entre 48 horas e 7 dias.

<b>Fórmula</b>	<b>g/L</b>
Peptona	10,0
Extrato de carne	5,0
Glicose	10,0
Cloreto de sódio	5,0
Ágar	15,0
-----	
pH: 7,5 ± 0,2	

### **Kits de identificação microbiana**

**API 20 Strep** - BioMérieux SA, Marcy-l'Etoile, France.

## **Descrição**

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

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

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

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

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

## **Procedimentos para identificação**

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

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

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

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

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP 1 e VP 2 no teste do piruvato de sódio (VP); ZYM A e ZYM B no teste de PYRA até LAP, e NIN no teste HIP. Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas de acordo com o quadro do item.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Api Strep Analytical Profile Index”.

**Rapid ID 32 Strep** - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France.

### **Descrição**

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para streptococos e microrganismos relacionados utilizando testes enzimáticos estandardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas que são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index.”ou o *mini API*.

### **Procedimentos para identificação**

Microrganismos são cultivados em placas Ágar sangue. A cultura pura foi anteriormente confirmada pela morfologia e coloração de Gram, produção de catalase e requerimento gasoso.

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

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

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes VP A e VP B no teste do VP (cúpula 0.0); FB nos testes APPA e GTA (cúpulas 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 e 0.5); e NIN no teste de HIP (cúpula 0.6). Todas as reações são lidas após 5 minutos baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 Strep Analytical Profile Index” ou a leitura é feita no aparelho **mini API**

**API Staph** - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France

### **Descrição**

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

### **Procedimentos para identificação**

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

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

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

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

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

**Rapid ID 32 A - BioMérieux SA, Marcy-l’Etoile, France**

### **Descrição**

Rapid ID 32 A é um sistema de identificação para anaeróbios utilizando testes enzimáticos standardizados e miniaturizados. Cada Kit contém 25 fitas, recipientes para incubação, folhas de resultados e um manual do Kit. Cada fita consiste de 32 cúpulas, 29 das quais são utilizadas para testes e contêm substratos desidratados. Após o período de

incubação de 4 horas, as reações podem ser lidas visualmente, e a identificação obtida usando o catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index.”

### **Procedimentos para identificação**

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

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

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

Após o período de incubação, são adicionados os reagentes NIT 1 e NIT 2 no teste do NIT (cúpula 0.0) para verificar a redução de nitratos; JAMES no teste IND (cúpula 0.1) para verificar a produção de indol; e FB nos testes de PAL a SerA (cúpula 0.2 a 0.E). Todas as reações são lidas baseadas em cores que são classificadas como reações positivas e negativas.

Os resultados são colocados em uma folha de resposta, os números correspondentes às reações positivas são somados, e os códigos numéricos obtidos correspondem a uma determinada espécie bacteriana e são interpretados no catálogo “Rapid ID 32 A Analytical Profile Index”.

### **Api 20 C AUX**

#### **Descrição**

Api 20 C AUX é um sistema de identificação preciso para a maioria dos fungos encontrados na clínica microbiológica.

O API 20 C AUX consiste em 20 microtubos contendo substratos desidratados para demonstração da atividade enzimática ou fermentação de açúcares. Os microtubos são inoculados com um meio semi-sólido e os fungos crescerão apenas se forem capazes de utilizar cada substrato. As reações são lidas em comparação com o crescimento controle e

identificação é obtida pelo catálogo *Analytical Profile Index* ou usando um programa computadorizado de identificação.

### **Procedimentos para identificação**

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

Um swab estéril de algodão é utilizado para inoculação da bactéria em 2 mL meio para suspensão “Suspension Medium” ou em água destilada estéril, para formar uma suspensão bacteriana homogênea com a turbidez equivalente ao padrão de McFarland 2. São colocados 100 µ L no tubo “C Medium”.

Uma pipeta estéril é então utilizada para preencher os microtubos da tira do API C AUX com o inóculo bacteriano preparado C Medium. Evite a formação de bolhas. Incubar a 30°C por 48-72 horas.

Após o período de incubação checar o crescimento, após 48 h o GLU deve estar mais turvo que o controle (cúpula “0” da galeria) para ser interpretada a leitura de toda galeria. Através do catálogo “Analytical Profile Index” os resultados numéricos obtidos pelas reações podem ser identificados.

**RapID ANA II** - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA.

### **Descrição**

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

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

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

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

### **Procedimentos para identificação**

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

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

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

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

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

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

**RapID NH system** - Innovative Diagnostic Systems Inc., Atlanta, GA., USA.

### **Descrição**

O sistema RapID NH é um método miniaturizado qualitativo empregado para identificação de espécies clinicamente significantes de *Neisseria* e *Haemophilus*, e também *Eikenella* e *Actinobacillus*, através de substratos convencionais e cromogênico.

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

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

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

### **Procedimentos para identificação**

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

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

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

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

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

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

## **TESTES ADICIONAIS**

### **Teste da fluorescência sob a luz Ultra-Violeta**

O teste de ondas de fluorescência longas de luz Ultra-Violeta (LW-UV) é usado para auxiliar na identificação de bacilos produtores de pigmento negro. Certos microrganismos, especificamente *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, apresentam uma fluorescência vermelha quando testados sob luz LW-UV (355nm) em câmara escura. O procedimento de aplicação de metanol, que é realizado se uma reação negativa é obtida, é usado para confirmar um resultado negativo ou evidenciar um positivo quando o teste é realizado em colônias velhas.

### **Especimens**

Colônias de bactérias produtoras de pigmento negro ou colônias morfológicamente suspeitas de pertencerem ao grupo das produtoras de pigmento negro isoladas em placas de Ágar após 7 dias de incubação.

### **Procedimento**

Numa câmara escura, expor a placa de Ágar com o microrganismo à luz LW-UV.

- Observe se as colônias desenvolvem uma fluorescência vermelha

- Se não observar nenhuma fluorescência faça o teste do metanol:

Adicione 0,1mL de metanol 100% ao tubo e emulsione uma colônia ou várias colônias de um mesmo microrganismo no metanol. Observe na câmara escura sob luz LW-UV. Se não houver mudança de cor está confirmado o resultado negativo, se desenvolver uma fluorescência vermelha é demonstrado um resultado positivo.

Colônias pigmentadas de negro que fluorescem sob a luz LW-UV podem ser identificadas como podem ser supostamente identificadas como pertencentes ao grupo das *P. intermédia/nigrescens* ou *P. melaninogenica*. Deve ser realizado o teste do MUG para diferenciação entre essas duas espécies.

Colônias suspeitas de pertencer ao grupo das bactérias produtoras de pigmento negro que não florescerem sob a luz LW-UV podem ser supostamente identificadas como *Porphyromonas gingivalis* ou podem ser colônias envelhecidas de *P. intermedia* ou *P. melaninogenica*. O teste do CAAM deve ser realizado para confirmar este resultado.

### **Teste MUG**

O teste do MUG é conveniente para distinguir *Prevotella intemedia/nigrescens* que é lactose negativa da *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella loescheii* e *Prevotella denticola*, que são positivas para a fermentação da lactose.

- Bacilos produtores de pigmento negro crescidos sobre uma placa de Ágar que fluorescem de vermelho sob a luz LW-UV são testadas com 4-methylum-belliferyl B-D-galactoside (MUG) (Sigma-Aldrich, USA). Fermentação da lactose depende da ação da B-galactosidase. Hidrólise do MUG pela B-galactosidase resulta na formação de 4-methylum-belliferone. Este é um composto com uma fluorescência brilhante sob a luz LW-UV.

### **Especimens**

Bactérias produtoras de pigmento negro que fluorescem sob a luz LW-UV crescidas durante sete dias sobre uma placa de ágar.

### **Procedimento**

- Dissolver o reagente MUG em dimethyl sulfoxide para atingir uma concentração final de 1%.

- Espalhe o reagente MUG sobre a placa contendo a bactéria que reagiu positivamente sob a luz LW-UV.
- Observe a placa com o reagente MUG na câmara escura sob luz UW-UV.
- Colônias pigmentadas de negro que fluorescem de vermelho sob a luz LW-UV e formam uma fluorescência brilhante quando reagem com o MUG podem ser (presuntivamente) identificadas como *P. melaninogênica*.
- Colônias pigmentadas de negro que fluorescem de vermelho sob a luz LW-UV e não formam fluorescência brilhante quando reagem com o MUG podem ser (supostamente) identificadas como *P. intermedia/nigrescens*.

### **Teste CAAM**

O teste do CAAM é baseado na habilidade de um organismo produzir fluorescência após hidrólise da tripsina. É um método rápido para identificar *Porphyromonas gingivalis*, que é a única bactéria produtora de pigmento negro *Prevotella* ou *Porphyromonas* que produz tripsina através da fluorescência pela atividade de tripsina.

### **Procedimento**

- Dissolver 0,006mg do CAAM em 5mL de DMSO e adicionar 5mL do tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0.
- Espalhe o reagente CAAM sobre a placa contendo a bactéria que não reagiu positivamente sob a luz LW-UV.
- Observe a placa com o reagente CAAM na câmara escura sob luz UW-UV.