

**EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA**

*Cirurgiã-dentista*

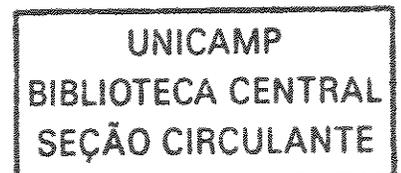
**Análise microbiológica de canais radiculares  
associados a abscessos periapicais e a  
suscetibilidade de bactérias anaeróbias  
prevalentes frente a diversos antibióticos**

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

200306977

**PIRACICABA**

**2003**



**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

**EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA**

*Cirurgiã-dentista*

**Análise microbiológica de canais radiculares  
associados a abscessos periapicais e a  
suscetibilidade de bactérias anaeróbias  
prevalentes frente a diversos antibióticos**

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

Orientador: Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz

Banca Examinadora: Prof. Dr. Eloi Dezan Junior

Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho

Profa. Dra. Brenda Paula F. A. Gomes

Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho

Este exemplar foi devidamente corrigido,  
de acordo com a Resolução CCPG-036/83  
datada em 30/03/2003

  
Assinatura do Orientador

**PIRACICABA  
2003**

UNIVERSIDADE	BC
CHAMADA	T/UNICAMP
	So85a
EX	
IBO BC/	52548
C.16-	124/03
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
ÇO	R\$ 11,00
A	13103102
CPD	

M00180276-1

3 10 253007

### Ficha Catalográfica

So85a      Sousa, Ezilmara Leonor Rolim de.  
 Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais e a suscetibilidade de bactérias anaeróbias prevalentes frente a diversos antibióticos. / Ezilmara Leonor Rolim de Sousa. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2003.  
 xxxii, 206p. : il.

Orientador : Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz.  
 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Microrganismos. 2. Endodontia. 3. Testes de sensibilidade bacteriana. I. Ferraz, Caio Cezar Randi. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8-6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 18 de Fevereiro de 2003, considerou a candidata EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA aprovada.

1. Prof. Dr. CAIO CEZAR RANDI FERRAZ

2. Prof. Dr. JOÃO EDUARDO GOMES FILHO

3. Prof. Dr. ELOI DEZAN JUNIOR

4. Prof. Dr. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

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

**Dedicado pelo Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho durante esta Defesa de  
Tese no dia 18 de fevereiro de 2003...**

Muitas vezes as pessoas  
são egocêntricas, ilógicas e insensatas.  
Perdoe-as assim mesmo.

Se você é gentil,  
as pessoas podem acusá-lo de interesseiro.  
Seja gentil assim mesmo.

Se você é um vencedor,  
terá falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.  
Vença assim mesmo.

Se você é honesto e franco,  
as pessoas podem enganá-lo.  
Seja honesto assim mesmo.

O que você levou anos para construir,  
alguém pode destruir de uma hora para outra.  
Construa assim mesmo.

Se você tem paz e é feliz,  
as pessoas podem sentir inveja.  
Seja feliz assim mesmo.

O bem que você faz hoje  
pode ser esquecido amanhã.  
Faça o bem assim mesmo.

Dê ao mundo o melhor de você,  
mas isso pode não ser o bastante.  
Dê o melhor de você assim mesmo.

Veja você que no final das contas,  
é tudo entre você e DEUS.  
Nunca foi entre você e os outros.

Madre Tereza de Calcutá

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

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

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

**Dedico este trabalho  
com amor.**

*Aos meus irmãos, **Erick e Evandro** e as minhas cunhadas **Kalinka e Carolina**, por todos os momentos felizes já vividos;*

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

Agradeço

*À DEUS,*

*por iluminar o meu caminho, me  
dar forças nessa caminhada e me  
manter firme no meu propósito.*

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

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

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

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

Ao **Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho**, coordenador do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP, pela atenção dispensada sempre que solicitado;

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

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

Aos professores da equipe de Endodontia da FOP/UNICAMP **Prof. Dr. Francisco José de Souza Filho, Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz, Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Prof. Dr. Fabrício Batista Teixeira, Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia** pelo estímulo e atenção dispensada sempre que solicitados;

À **Profa. Dra. Altair Antoninha Del Bel Cury** pelo apoio, pela atenção com que sempre me dirigiu e pela confiança depositada no meu profissionalismo; Muito obrigada por ter a sua amizade e seu carinho;

Aos **Professores da área de Farmacologia** da FOP/UNICAMP pelo apoio e confiança, especialmente **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo** pela capacidade de transmitir conhecimentos que valorizaram o desenvolvimento deste trabalho, e pela atenção e carinho que sempre me atendeu;

Aos **Professores da área de Microbiologia, especialmente Prof. Dr. José Francisco Höfling** da FOP/UNICAMP, pela confiança e atenção;

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

Aos colegas do curso de mestrado em Endodontia **Helena Rabang, Nilton Gomes, Daniel Oliveira, Douglas Cortez, Morgana Vianna, Rogério Castilho, Fábio Dametto, Iadasa de Quadros**, pelo convívio e carinho, cada um tem algo de especial para mim, obrigada;

Ao **Rogério Castilho** (mestrado em endodontia FOP-UNICAMP) por ajudar diretamente em várias etapas deste trabalho, muito obrigada;

As minhas amigas **Helena Rabang** (mestrado em endodontia FOP-UNICAMP) e **Tétis Sauáia** pelo incansável auxílio, apoio, companheirismo e por serem pessoas tão especiais, muito obrigada.

Aos estimados amigos de Doutorado em Endodontia, **Ronaldo Rodrigues, Cícero Gadê-Neto, Ericka Pinheiro, Eduardo Gurgel, Adelmo Souza-Filho, Júlio Bento dos Santos, Egas de Aragão e Alexandre Heck** pelo companheirismo e colaboração inestimável;

A **Flaviana Ferreira** (Doutoranda em Endodontia USP-Bauru) pelos momentos grandiosos que trocamos conhecimentos científicos e também pelo convívio e carinho;

Aos estagiários **Maraísa Delboni, Neylla Sena, Patrick Baltieri, Fernanda Signoretti, Débora de Almeida e Danila Zilo** pelo carinho, atenção, companheirismo e amizade;

Às amigas do curso de pós-graduação da FOP/UNICAMP, **Viviane Maia Oliveira, Liliana Torres e Ana Claudia Amoras Alves**, pelo carinho e incentivo nos momentos difíceis;

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

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

As funcionárias da Clínica da FOP-UNICAMP **Maria Aparecida Riva e Maria Elidia N. Pereira** pela atenção e auxílio prestados durante o atendimento de pacientes, muito obrigada;

As secretárias da Pós-graduação da FOP/UNICAMP **Erica Pinho e Sônia Maria L. Arthur**, pela amizade e pelo carinho com que sempre me atenderam;

A **Mônica Aparecida Bernabé** secretária da Pós-graduação em clínica odontológica (FOP/UNICAMP) pela atenção dispensada sempre que solicitada;

A **Biblioteca e a todos os funcionários** que me ajudaram na obtenção da literatura deste trabalho, meu muito obrigada.

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

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

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

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b>	01
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	02
<b>RESUMO</b>	03
<b>ABSTRACT</b>	04
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	05
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	07
<b>2.1. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais</b>	07
<i>2.1.1. Microbiologia e a endodontia</i>	07
<i>2.1.2. A técnica de cultura e as técnicas moleculares</i>	09
<i>2.1.3. Vias de acesso dos microrganismos aos canais radiculares</i>	13
<i>2.1.4. Determinantes ecológicos</i>	16
<i>2.1.5. Composição bacteriana</i>	18
<i>2.1.6. Os abscessos periapicais</i>	22
a) Definição e diagnóstico clínico	22
b) Fases evolutivas patogênicas	24
c) Aspectos Clínicos	25
d) Aspectos Radiográficos	26
e) Tratamento	27
f) Complicações e conseqüências clínicas	29
g) Microbiota	29

<b>2.2. Análise da suscetibilidade antimicrobiana</b>	35
2.2.1. <i>Antibióticos – mecanismo de ação e resistência</i>	35
a) Penicilinas	38
b) Cefalosporinas	42
c) Macrolídeos	43
d) Lincosaminas	47
e) Metronidazol	49
2.2.2. <i>A Escolha do agente antimicrobiano</i>	51
2.2.3. <i>Testes de suscetibilidade antimicrobiana</i>	55
2.2.4. <i>Métodos para avaliação dos testes de suscetibilidade antimicrobiana</i>	57
a) Epsilometer test ( <i>E-test</i> )	59
b) Teste de $\beta$ -lactamase	66
<b>3 PROPOSIÇÃO</b>	72
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	73
<b>4.1. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais</b>	73
4.1.1. <i>Seleção dos pacientes</i>	73
4.1.2. <i>Avaliação dos pacientes</i>	73
4.1.3. <i>Critérios clínicos para diferenciação da localização dos abscessos periapicais</i>	74

4.1.4. <i>Coleta das amostras</i>	75
4.1.5. <i>Inoculação e Incubação</i>	78
4.1.6. <i>Isolamento e Identificação microbiana</i>	82
4.1.7. <i>Especiação microbiana</i>	84
4.1.8. <i>Análise estatística</i>	89
<b>4.2. Análise da suscetibilidade antimicrobiana</b>	89
4.2.1. <i>Epsilometer Test (E-test)</i>	89
4.2.2. <i>Teste de <math>\beta</math>-lactamase</i>	95
<b>5 RESULTADOS</b>	98
<b>5.1. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais</b>	98
5.1.1. <i>Composição da microbiota de canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais e frequência de dados clínicos</i>	98
5.1.2. <i>Frequência da localização clínica dos abscessos periapicais</i>	105
5.1.3. <i>Correlação entre espécies bacterianas específicas e a localização clínica dos abscessos periapicais e entre os diferentes sinais e sintomas</i>	106
<b>5.2. Análise da suscetibilidade antimicrobiana</b>	106
5.2.1. <i>Epsilometer test (E-test)</i>	106
5.2.2. <i>Teste de <math>\beta</math>-lactamase</i>	110
<b>6 DISCUSSÃO</b>	111
<b>6.1. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais</b>	111

<b>6.2. Análise da suscetibilidade antimicrobiana</b>	128
<b>7 CONCLUSÕES</b>	138
<b>REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA</b>	139
<b>ANEXOS</b>	177
ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecimento específico para a pesquisa	177
ANEXO 2 - Certificado do Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Piracicaba	182
ANEXO 3 - Meio de transporte	183
ANEXO 4 - Meios de cultura não seletivos	185
ANEXO 5 - “Kits” de identificação	186
ANEXO 6 - Testes adicionais	213
ANEXO 7 – Aspectos Clínicos, Radiográficos e microbiológicos dos 60 pacientes	220

<b>LISTAS DE TABELAS</b>	01
TABELA 1-Bactérias comumente isoladas de polpas necróticas infectadas.	20
TABELA 2-Bactérias comumente isoladas de abscessos periapicais.	33
TABELA 3-Antibióticos utilizados na odontologia	38
TABELA 4-Critérios clínicos para diferenciar os abscessos periapicais quanto à localização.	74
TABELA 5-Frequência do número de cepas bacterianas encontradas nos canais radiculares infectados associados com abscessos periapicais	103
TABELA 6-Composição da microbiota de canais radiculares associados a abscessos periapicais	104
TABELA 7-Frequência dos abscessos periapicais quanto a localização (n=60).	105
TABELA 8-Perfil de sensibilidade do microrganismo <i>P. prevotii</i>	107
TABELA 9-Perfil de sensibilidade do microrganismo <i>Fusobacterium necrophorum</i> .	107
TABELA 10-Perfil de sensibilidade do microrganismo <i>Fusobacterium nucleatum</i> .	108
TABELA 11-Perfil de sensibilidade do microrganismo <i>Peptostreptococcus micros</i> .	109
TABELA 12-Perfil de sensibilidade do microrganismo <i>Prevotella intermedia</i> .	109
TABELA13-Aspectos clínicos e radiográficos dos 60 pacientes com canais radiculares associados a abscessos periapicais.	220
TABELA14-Achados microbiológicos dos 60 pacientes com canais radiculares associados a abscessos periapicais e a localização clínica dos respectivos abscessos encontrados.	222

<b>LISTAS DE FIGURAS</b>	02
FIGURA 1- Enzima $\beta$ -lactamase hidrolisando o anel $\beta$ -lactâmico.	66
FIGURA 2- Coleta da amostra microbiológica.	77
FIGURA 3- Sistema de gás utilizado durante a coleta microbiológica.	78
FIGURA 4- Procedimentos utilizados durante a coleta microbiológica.	80
FIGURA 5- Avaliação das placas contendo ágar-sangue e crescimento bacteriano por meio da lupa estereoscópica, em aumento de 3 vezes.	82
FIGURA 6- Procedimentos utilizados durante a análise microbiológica.	85
FIGURA 7- Testes adicionais para os microrganismos pigmentados de negro.	88
FIGURA 8- Fita de <i>E-test</i> .	90
FIGURA 9- Procedimentos utilizados durante a análise da suscetibilidade antimicrobiana com o <i>E-test</i> .	94
FIGURA 10- Placa utilizada na avaliação do <i>E-test</i> .	95
FIGURA 11- Procedimento utilizado durante o teste de $\beta$ -lactamase.	97
FIGURA 12- Composição da microbiota dos canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais.	101
FIGURA 13 – Prevalência das espécies bacterianas (% de casos) (n=60).	102
FIGURA 14 – Prevalência dos gêneros bacterianos isolados de 60 canais radiculares com abscessos periapicais.	107

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar a composição da microbiota de canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais; analisar a correlação entre espécies bacterianas específicas com a localização clínica dos abscessos periapicais, sinais e sintomas e testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas prevalentes. As amostras microbiológicas foram coletadas de 60 canais radiculares usando pontas de papel estéreis, transportadas em RTF, diluídas, plaqueadas e incubadas em câmara de anaerobiose. Colônias microbianas foram isoladas, caracterizadas e identificadas por métodos padronizados. Das 287 diferentes espécies bacterianas, 201 eram anaeróbias estritas. Uma ou mais (máximo de 14) espécies bacterianas foram recuperadas de 59 (98,3%) canais radiculares, confirmando a característica polimicrobiana das infecções endodônticas. As bactérias anaeróbias estritas mais freqüentemente isoladas foram: *Peptostreptococcus prevotii* (22/60), *Peptostreptococcus micros* (19/60), *Fusobacterium necrophorum* (19/60). Embora menos freqüentes, bactérias facultativas como *Gemella morbillorum* (19/60), *Streptococcus mitis* (13/60), e *Streptococcus sanguis* (11/60) também foram encontradas. O teste de Pearson ou teste exato de Fisher mostrou que houve relação positiva de algumas espécies bacterianas com a localização do abscesso periapical, bem como, com alguns sinais e sintomas de origem endodôntica ( $p < 0,05$ ). Os resultados indicaram predominância de bactérias anaeróbias Gram-positivas e a presença de microbiota mista nos canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais. O método do *E-test* revelou sensibilidade bacteriana das espécies testadas aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato de potássio, metronidazol, clindamicina e cefaclor, contudo, certos microrganismos foram resistentes a azitromicina e eritromicina. Enquanto que, nenhum dos microrganismos testados produziu  $\beta$ -lactamase.

Palavras-Chave: Abscessos periapicais; Microrganismos; Canal radicular; Suscetibilidade antimicrobiana,  $\beta$ -lactamase.

## ABSTRACT

### **Microbiological study of infected root canals associated with periapical abscesses and the susceptibility of prevalent strict anaerobes bacteria**

The aim of this study was to investigate the composition of the microbiota of infected root canals associated with periapical abscesses, to investigate the correlation of specific species of bacteria with the clinical localization of the periapical abscesses, signs, and symptoms, and to test the susceptibility of prevalent strict anaerobic bacteria isolated. Microbiological samples were collected from 60 root canals using sterile paper points, transported in RTF and diluted, plated and incubated in an anaerobic chamber. Microbial colonies were then purified, characterized and identified by established methods. Of the 287 different bacterial species recovered, 201 were strict anaerobes or microphilic species. One or more (maximum of 14) bacterial species were recovered from 59 (98.3%) root canals, showing the polymicrobial characteristic of endodontic infections. The most frequently strict anaerobes isolated were: *Peptostreptococcus prevotii* (22/60), *Peptostreptococcus micros* (19/60), *Fusobacterium necrophorum* (19/60). Although less frequent, facultative bacteria such as *Gemella morbillorum* (19/60), *Streptococcus mitis* (13/60), and *Streptococcus sanguis* (11/60) were also found. The Pearson  $X^2$  test or Fisher's exact test showed positive relationship among some bacterial species and the localization of periapical abscesses as well as with some endodontic signs and symptoms ( $p < 0.05$ ). Results indicated predominance of Gram-positive anaerobic bacteria in the mixed microbiota of dental root canals associated with periapical abscesses. The *E-test* revealed bacterial susceptibility to benzylpenicillin, amoxicillin, amoxicillin/potassium clavulanate, clindamycin and cefaclor. All microorganisms tested did not produce  $\beta$ -lactamase.

KEY-WORDS: Periapical abscess; Microorganisms; Root canals; Antibiotic susceptibility,  $\beta$ -lactamase.

## 1 INTRODUÇÃO

Sabendo-se que as bactérias são os principais fatores na etiologia, desenvolvimento e manutenção das alterações pulpares e periapicais, o tratamento dos canais radiculares tem como um dos objetivos principais combater bactérias, neutralizar e remover subprodutos bacterianos e substratos do interior dos canais radiculares, através de métodos químico-mecânicos adequados que consigam romper e destruir o ecossistema microbiano, impedir que os microrganismos e seus produtos tóxicos atinjam os tecidos periapicais, causando alterações nesta região.

Dentre as alterações periapicais encontram-se os abscessos periapicais, que são reações inflamatórias agudas caracterizadas por coleções purulentas localizadas, estando implícito o caráter agudo de sua ocorrência do ponto de vista microscópico e clínico; havendo presença abundante de neutrófilos, com amplas áreas de destruição tecidual e fenômenos vasculares exsudativos e presença de dor (CONSOLARO & RIBEIRO, 1998). Estão freqüentemente associados com destruição relativamente rápida do osso alveolar e têm a capacidade de disseminar e alcançar seios paranasais e outros espaços da cabeça e pescoço (WILLIAMS *et al.*, 1983; KULEKÇI *et al.*, 1996).

O diagnóstico de um abscesso periapical é difícil e restringe-se a história clínica. Desta maneira, o tratamento baseia-se na drenagem cirúrgica e debridamento do sistema de canais radiculares. Quando necessário, associada à drenagem, uma adequada terapêutica medicamentosa sistêmica pode ser administrada (GUTMANN & HARRISON, 1994; SOUZA-FILHO *et al.*, 2002).

Assim, como a necessidade de se prescrever um antibiótico é imediata, a escolha deve ser baseada no conhecimento atualizado da microbiologia endodôntica (ABBOTT *et al.*, 1990). Os resultados dos exames microbiológicos e dos testes de suscetibilidade demoram no mínimo de 4 a 10 dias, entretanto, os padrões de suscetibilidade das bactérias aos antibióticos de rotina estão sempre mudando com o selecionamento de bactérias

resistentes, tornando-se dessa maneira, importante o monitoramento desse padrão através dos testes de suscetibilidade antimicrobiana, permitindo o desenvolvimento de métodos de ação para um tratamento mais eficaz (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; FORBES *et al.*, 1998).

O conhecimento da microbiota bacteriana associada aos abscessos periapicais é importante no desenvolvimento e entendimento deste processo patológico, bem como, seu comportamento frente a diversos antimicrobianos, podendo, portanto, colaborar no desenvolvimento da prática endodôntica. Portanto o objetivo deste trabalho foi investigar a composição da microbiota de canais radiculares infectados, associados a abscessos periapicais; determinar se há correlação entre espécies bacterianas específicas e a localização clínica dos abscessos periapicais, bem como com alguns sinais e sintomas endodônticos e avaliar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas mais prevalentes de canais radiculares associados com abscessos periapicais, frente a diversos antibióticos, através de teste de suscetibilidade antimicrobiana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2. 1. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais

#### 2.1.1 *Microbiologia e a Endodontia*

A Microbiologia vem enriquecendo a Endodontia, mostrando caminhos mais adequados para um tratamento mais eficaz. Até o final do século XIX não se tinha conhecimento do papel dos microrganismos orais no desenvolvimento de alterações inflamatórias pulpare e periapicais. Desta forma, a Endodontia era praticada empiricamente, visando somente, a remoção da dor e obturação dos canais radiculares. Em 1894, MILLER foi o primeiro pesquisador a relatar a associação entre bactérias e as alterações pulpare e perirradiculares após análise de amostras microbiológicas coletadas de canais radiculares, identificando grande variedade de células bacterianas, compreendendo os três tipos morfológicos conhecidos: cocos, bacilos e espirilos.

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

Em um estudo bacteriológico de 16 abscessos alveolares e 8 canais radiculares infectados, GILMER & MOODY (1914) observaram em cultura anaeróbia a presença de “*Bacillus fusiformis*” com espécies de *Streptococcus*. Também verificaram a presença de bactérias de pigmento negro em 3 abscessos e, dentro do conhecimento da época, acreditaram que essas bactérias não teriam qualquer importância com a infecção estudada. Afirmaram que os abscessos poderiam ser curados pelo tratamento das raízes dos dentes, outros ainda pela intervenção cirúrgica ou pela extração dental.

COOLIDGE (1919) defendeu que a cultura microbiológica deveria ser adaptada como procedimento de rotina clínica na terapia endodôntica. Assim, o sucesso do

tratamento endodôntico dependeria da esterilidade do canal radicular, confirmada pela cultura bacteriana antes da obturação. Com o passar dos tempos foram surgindo opiniões contrárias à necessidade de se fazer esse procedimento para se obter o sucesso endodôntico (BENDER *et al.*, 1964; MORSE, 1971).

O interesse na microbiota do canal radicular se renovou especialmente após o isolamento de bactérias anaeróbias estritas de pigmento negro da polpa dental, e a associação destes microrganismos com aspectos clínicos (SUNDQVIST, 1976; YOSHIDA *et al.*, 1987; GOMES, 1995; GOMES 2002). Assim, estes estudos mostraram que a cultura microbiológica tem seu lugar na Endodontia.

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

KANTZ & HENRY (1974) introduziram a técnica para cultura anaeróbia, utilizando para isso o meio de transporte “Reduced Transport Fastidious” (RTF). Na coleta microbiana colocaram o RTF no interior do canal radicular, e em seguida realizaram a coleta com pontas de papel absorvente, possibilitando a identificação de anaeróbios nos tecidos pulpares e periapicais.

Outra melhoria foi o surgimento de “kits” comerciais para a identificação de microrganismos, inclusive anaeróbios estritos, que passaram a permitir análises rápidas, seguras e economicamente viáveis. Os “kits” de identificação são baseados em testes bioquímicos distintos através de reações enzimáticas. A interpretação dos resultados dos testes enzimáticos não é complicada, devido às várias reações que ocorrem no complexo

meio de cultura contendo o substrato (VAN WINKELHOFF *et al.*, 1988). Além do mais, segundo GOMES *et al.* (1994b) os “kits” comerciais também evitam muitos problemas que podem ocorrer pelas variações interlaboratoriais, por exemplo os reagentes utilizados.

### **2.1.2. A técnica de cultura e as técnicas moleculares**

Até o momento não existe um único método capaz de isolar todos os microrganismos presentes na cavidade pulpar e estruturas relacionadas. Testes bacteriológicos (incluindo a microscopia de luz, de campo escuro e de contraste de fase) deveriam ser usados em conjunto com os métodos moleculares (PCR, sondas de DNA, etc), testes imunológicos (imunofluorescência e ELISA) e testes enzimáticos (BANA= substrato da tripsina sintética, Benzoil-DL-Arginina-naftilamida) para detectar e quantificar o maior número possível de espécies bacterianas (GOMES, 1995).

Contudo, cultura é um dos métodos mais utilizados, que detecta a viabilidade microbiana (capacidade de se reproduzir). Historicamente tem sido o método mais utilizado para determinar a esterilidade, ou pelo menos, a redução da população microbiana de maneira a não apresentar crescimento no meio de cultura empregado (GOMES, 1995). Entretanto, requer metodologia elaborada para isolamento e crescimento bacteriano. Além disso, algumas das bactérias envolvidas nas infecções endodônticas são fastidiosas e extremamente sensíveis ao oxigênio. Conseqüentemente, a cultura pode falhar em detectar alguns microrganismos presentes nas infecções endodônticas (NISSAN *et al.*, 2000). Porém, este método pode ser utilizado principalmente para a determinação do padrão de sensibilidade antimicrobiana das bactérias patogênicas, que está sempre mudando com a possibilidade de surgimento de bactérias resistentes.

Durante os anos 70 o isolamento de anaeróbios estritos através do uso de meios pré-reduzidos, primeiramente desenvolvidos para a microbiologia médica, foi adaptado para a microbiota oral. Outra inovação foi o surgimento da câmara de anaerobiose. O trabalho clássico usando técnicas anaeróbias estritas foi desenvolvido por SUNDQVIST

(1976) que foi o primeiro a correlacionar microrganismos específicos com sinais e sintomas de origem endodôntico.

Hoje em dia avanços na microbiologia molecular têm permitido a identificação de espécies bacterianas não cultiváveis e também elucidando mecanismos de transmissão e patogenicidade de certos microrganismos orais em outros locais do organismo.

Com o desenvolvimento de técnicas moleculares de identificação microbiana PCR, *dot-blot hybridization*, *checkerboard DNA-DNA hybridization*, vários autores têm preferido estes métodos à cultura para o isolamento de microrganismos dos canais radiculares, por sua alta sensibilidade e habilidade de detectar microrganismos incultiváveis (ABOU-RASS & BOGEN, 1998; BAUMGARTNER *et al.*, 1999; BOGEN & SLOTS, 1999; MAKKAR *et al.*, 1999; VAFAIE *et al.*, 1999; JUNG *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2001a,b,c).

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 bactérias de pigmento negro com os sinais e sintomas clínicos apresentados pelos pacientes. Utilizaram métodos laboratoriais convencionais, para identificação de espécies de bactérias de pigmento negro e *polymerase chain reaction*-PCR, para diferenciar *Prevotella intermedia* de *Prevotella nigrescens*. Análise estatística dos resultados não encontrou relação significativa entre bactérias de pigmento negro e a presença de sinais e sintomas clínicos específicos.

STUBBS *et al.* (1999) utilizaram 16S rDNA *polymerase chain reaction*-PCR e subsequente hibridização para distinguir as espécies de *P. intermedia* das espécies 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.

SIQUEIRA *et al.* (2000) examinando a microbiota de canais infectados com a utilização de métodos moleculares genéticos específicos encontraram uma predominância de *Bacteroides forsythus* (39%), *Haemophilus aphrophilus* (25%), *Corynebacterium matruchotii* (27%), *Porphyromonas gingivalis* (17%) e *Treponema denticola* (17,9%). As espécies predominantemente encontradas foram diferentes de outros estudos e uma das prováveis razões para isto, segundo os autores, são os diferentes métodos de identificação utilizados.

OLIVEIRA *et al.* (2000) utilizaram 16S rRNA-PCR para identificar *P. endodontalis* em 44 canais radiculares com polpas necrosadas. Todos os dentes, com exceção de 2 apresentavam lesões periapicais. Em 19 dentes com dor à percussão, 2 casos estavam associados com fistula e 6 foram diagnosticados como abscesso periapical agudo. Os outros casos estavam assintomáticos. *P. endodontalis* foi detectada em 39,5% dos casos (17/43 casos). Estava presente em 4 dos 6 casos com abscesso perirradicular agudo (66,7%), em 6 casos com lesões perirradiculares assintomáticas, 10 casos com dor à percussão (52,6%) e 1 caso de fistula. Foi também encontrada em 1 caso assintomático sem evidência de patologia perirradicular. Entretanto, a alta prevalência de *P. endodontalis* em abscessos perirradiculares agudos sugere que esta bactéria tem potencial para ser um importante patógeno endodôntico.

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

SIQUEIRA *et al.* (2001b) utilizaram PCR para detectar a ocorrência de 4 bastonetes anaeróbios formadores de pigmento negro (*Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*), *Treponema*

*denticola* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans* no pus coletado de 10 casos com abscessos perirradiculares agudos. Bastonetes anaeróbios formadores de pigmento negro estavam presentes em 80% dos abscessos examinados, *P. endodontalis* foi encontrada em 70%, *T. denticola* em 50%, *P. gingivalis* em 40% e *P. intermedia* em 10%. *P. gingivalis* estava sempre associada à *P. endodontalis*. *Prevotella nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans* não foram encontrados em nenhuma amostra de pus. Os autores concluíram que *P. endodontalis*, *T. denticola* e *P. gingivalis* podem ter um papel importante na etiologia dos abscessos perirradiculares agudos.

SIQUEIRA *et al.* (2001c) avaliaram a microbiota de abscessos perirradiculares pelo método de hibridização de DNA-DNA. As amostras foram obtidas por aspiração de 27 casos e observaram a ocorrência de 49 espécies bacterianas. As espécies mais prevalentes encontradas foram *Bacteroides forsythus* (29,6%), *Porphyromonas gingivalis* (29,6%), *Streptococcus constellatus* (25,9), *Prevotella intermedia* (22,2%), *Prevotella nigrescens* (22,2%), *Fusobacterium periodonticum* (18,5%), *Fusobacterium nucleatum* (18,5%) e *Eikenella corrodens* (18,5%).

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.

MORAES *et al.* (2002) compararam 3 métodos de identificação bacteriana: cultura, PCR e “checker-board DNA-DNA hybridization” para detecção de *Fusobacterium nucleatum* nas infecções endodônticas. Foram investigados 13 canais radiculares com polpas necrosadas e evidências radiográficas de lesões periapicais. Combinando todos os métodos, os resultados indicaram que *F. nucleatum* estava presente em aproximadamente

31% das amostras (4/13). A incidência de *F. nucleatum* nas infecções dos canais radiculares através do PCR, cultura e DNA-DNA hibridização foi de 15,4%, 15,4% e 10%, respectivamente.

### **2.1.3. Vias de acesso dos microrganismos aos canais radiculares**

A condição pulpar é fator importante na suscetibilidade à invasão microbiana. Polpas vivas são mais resistentes a invasão microbiana, podendo dificultar e até impedir a penetração de microrganismos. Já as polpas necróticas são rapidamente invadidas e colonizadas por bactérias pois, a falta de circulação sangüínea compromete os mecanismos de defesa do hospedeiro e, os produtos da degradação pulpar servem como nutrientes essenciais à sobrevivência de microrganismos (CVEK, *et al.*, 1987). Da mesma forma, TAKAHASHI (1998) considera os canais radiculares, com polpa necrótica, ambiente favorável à colonização e proliferação bacteriana, devido à ausência de circulação sangüínea e a possibilidade de estagnação e degradação de componentes protéicos dos fluidos tissulares. Estes podem transformar-se em substratos necessários para a sobrevivência de microrganismos, desencadeando reações de defesa no hospedeiro, caracterizadas pelo desenvolvimento de lesão periapical.

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

Túbulos dentinários associados a uma polpa vital não são facilmente invadidos por bactérias (NAGAOKA *et al.*, 1995). A presença de prolongamentos odontoblásticos, de fibras colágenas, da lâmina limitante e do fluido dentinário em túbulos de uma dentina vital

pode retardar a invasão intratubular. Outros fatores, como esclerose dentinária; dentina reparadora; *smear layer* e deposição de proteínas plasmáticas, como fibrinogênio, nas paredes tubulares, pode limitar ou impedir o avanço bacteriano via túbulos dentinários. Por sua vez, túbulos dentinários de dentes tratados endodonticamente ou com polpa necrosada são facilmente invadidos por bactérias (NAGAOKA *et al.*, 1995; SEN *et al.*, 1995), constituindo-se importantes reservatórios de microrganismos, por meio dos quais a reinfecção pode ocorrer.

Teoricamente, a comunicação entre a polpa e o ligamento periodontal ocorre através de foraminas, deltas apicais, canais laterais, acessórios, interradiculares e os túbulos dentinários (DONGARI & LAMBRIANIDIS, 1988). Embora uma relação de causa e efeito exista entre infecção do canal radicular e lesões laterais ou periapicais, a penetração de bactérias em direção à polpa durante a doença periodontal é um tema de controvérsias e investigações (TORABINEJAD & KIGER, 1985). Outros exemplos desta comunicação podem ocorrer através de reabsorção radicular externa, fraturas, procedimentos iatrogênicos, entre outros (DE DEUS, 1975). Entretanto, existem fortes evidências de que a total desintegração do tecido pulpar, caracterizada por necrose, apenas ocorre quando a doença periodontal atinge o forame apical. Nesses casos o feixe vaso-nervoso principal que penetra pelo forame apical pode ser lesado, havendo necrose pulpar. A invasão bacteriana pelo forame fica facilitada, uma vez que a polpa não tem mais como combatê-la (LANGELAND *et al.*, 1977).

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

Essa via de contaminação poderia explicar a infecção pulpar em dentes traumatizados portadores de coroa dental hígida, demonstrada pelo trabalho de SUNDQVIST (1976) que investigando amostras microbiológicas de 32 dentes traumatizados com polpa necrótica e coroas intactas, verificou a prevalência de 90% de anaeróbios estritos do total das espécies isoladas.

Em 1941, ROBINSON e BOLING mencionaram que polpas infectadas ou presença de lesão periapical podem ocorrer devido aos seguintes cursos de eventos 1) irritação da polpa durante o procedimento operatório ou pós-operatório com produção de pulpíte assintomática; 2) subsequente desenvolvimento de uma bacteremia transitória, ou 3) anacorese com infecção da polpa. Tais inflamações pulpares podem ocorrer em intervalos longos após o tratamento dental sendo então classificadas de “pulpíte anacorética”.

Apesar disso, muitos autores discordam e apresentam outra hipótese. O esmalte dental, quando acometido por um traumatismo, pode apresentar rachaduras e/ou fissuras, ou acentuá-las (se já existirem), expondo a dentina em profundidades variáveis. Estas são na maioria das vezes, imperceptíveis clinicamente. Assim, através delas, bactérias podem invadir os túbulos dentinários expostos, os quais não oferecem maior resistência, uma vez que o seu conteúdo encontra-se necrosado e sem função, como resultado da necrose pulpar advinda do trauma (WITTIGOW & SABISTON, 1975; SUNDQVIST, 1976). Caso a injúria traumática não comprometa a vitalidade pulpar, bactérias não conseguirão invadir os túbulos e, desta forma, alcançar a polpa .

Segundo WHITE (1976) existe também a hipótese de que bactérias de dentes adjacentes podem invadir a polpa de dentes saudáveis via forame apical, causando inflamação ou mesmo a necrose da polpa.

KAKEHASHI *et al.* (1965) expuseram polpas vitais de dentes de ratos *germ-free* e convencionais, ao meio bucal. Nos ratos convencionais observaram a necrose da polpa, seguida de inflamação e formação de lesão periapical. Quando os mesmos

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

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

#### **2.1.4. Determinantes ecológicos**

Mais de 500 espécies bacterianas são reconhecidas atualmente na microbiota normal da cavidade oral, sendo potenciais infectantes dos canais radiculares (JUNG *et al.*, 2000). Entretanto, apenas um grupo restrito de espécies (cerca de 150) é capaz de colonizar o canal radicular. Vários fatores promovem a seleção das bactérias dos canais radiculares, dentre eles se incluem fatores nutricionais, baixo potencial de óxido-redução, pH, temperatura, interações positivas e antagonismos entre bactérias, resistência do hospedeiro e presença de agentes antimicrobianos e inibidores. Estes fatores tendem a favorecer o

crescimento de espécies anaeróbias (BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; MARSH & MARTIN, 1992; SUNDQVIST, 1992 a, b).

Microorganismos são freqüentemente classificados como anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos, de acordo com sua capacidade de crescimento na presença ou na ausência de oxigênio. Porém, uma taxa de tolerância para o oxigênio ocorre entre os anaeróbios estritos. Entretanto, os aeróbios estritos são raramente encontrados na cavidade oral. Além disso, existem alguns organismos que são capnofílicos (necessitam de CO<sub>2</sub>) e outros que são microaerofílicos (aqueles que necessitam de baixa concentração de oxigênio para o crescimento) (SUNDQVIST, 1992b; GOMES, 1995; GOMES, 2002).

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

No sistema de canais radiculares, os nutrientes são derivados dos fluidos teciduais e dos tecidos pulpares desintegrados, conforme SUNDQVIST (1992a), inicialmente os carboidratos são utilizados gerando ácidos lático e fórmico; subseqüentemente, as proteínas sofrem hidrólise, alguns amino-ácidos passam a ser fermentados e os carboidratos restantes, derivados de glicoproteínas séricas, são utilizados; na última fase ocorre a progressiva degradação protéica, com expressiva fermentação de amino-ácidos e peptídeos.

As interações entre as espécies bacterianas presentes nos canais radiculares infectados podem ser positivas quando uma espécie bacteriana utiliza como nutriente subprodutos metabólicos de outra. Isto ocorre, por exemplo, com os bacilos produtores de pigmento negro, os quais necessitam de vitamina K (menadiona) que é fornecida por

*Veillonella* spp., hemina, fornecida por *Campylobacter* spp. e succinato fornecido por *Fusobacterium* spp., *Eubacterium*, spp., *Peptostreptococcus* spp., *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Streptococcus* spp, *Actinomyces* spp., como subprodutos metabólicos (SUNDQVIST, 1992a; GOMES *et al.*, 1994b, 1996a).

Por outro lado, alguns subprodutos podem agir como toxinas, dependendo das espécies de bactérias que os produzem e de suas concentrações no ecossistema do canal radicular. Como exemplo, podemos citar os facultativos *Streptococcus sanguis*, que produzem bacteriocina (ex. sanguina), que é uma molécula protéica de alto peso molecular. Sanguina inibe o crescimento de bactérias anaeróbias estritas como *Prevotella* spp. e de bactérias CO<sub>2</sub>-dependentes (ex. *Capnocytophaga* spp.) (SUNDQVIST, 1992a; GOMES *et al.*, 1994b). Desta forma, as interações bacterianas também podem ter efeito negativo, inibindo o crescimento de certas espécies e aumentando as chances do hospedeiro reagir contra o agente infeccioso e restaurar a sua saúde (GOMES, 1995).

#### **2.1.5. Composição bacteriana**

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

Na microbiota do canal radicular infectado (TAB.1), os gêneros bacterianos mais comumente isolados são os anaeróbios facultativos *Streptococcus* e os gêneros

relacionados tais como *Enterococcus* e *Gemella*, e os anaeróbios estritos como *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Propionibacterium*, *Bifidobacterium*, *Veillonella* e *Capnocytophaga*. Também têm sido encontrados menos freqüentemente os gêneros *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eikenella*, *Staphylococcus*, *Mitsuokella* e *Wollinella*. Ocasionalmente é relatada a presença dos gêneros facultativos como *Enterobacter*, *Bacillus*, *Tissierella*, *Campylobacter* e *Actinobacillus*. Mais raramente são isolados os facultativos *Hafnia*, *Salmonella*, *Proteus*, *Aerobacter* e *Alcaligenes*, e os aeróbios *Mycobacteria*, *Nocardia*, *Mima*, *Pseudomonas*, e *Micrococcus*. *Hafnia* não é normalmente encontrada na boca, mas pode estar presente como um contaminante da água usada nas tubulações do equipo odontológico (MORSE, 1987; SUNDQVIST, 1994; GOMES, 1995; GOMES, 2002).

TABELA 1  
Bactérias comumente isoladas de polpas necróticas infectadas.

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

FONTE: GOMES, 1995.

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

Raramente tem sido relatada a presença de espiroquetas em canais radiculares infectados. Contudo, THILO *et al.* (1986) utilizando a microscopia de campo escuro relataram a presença de 6% de espiroquetas em canais radiculares. NAIR (1987), por meio da microscopia óptica e eletrônica em dentes com tecido pulpar necrótico e periapicalmente afetados, observou a presença de espiroquetas em canais radiculares, relatando que quando os microrganismos atingiam o corpo da lesão, havia reação por polimorfonucleares (PMN) e formação de abscessos. Do mesmo modo TROPE *et al.* (1988) estudando o diagnóstico de diferenciação de exsudato de abscesso endodôntico e periodontal encontraram espiroquetas em canais radiculares. Também (SIQUEIRA *et al.*, 2001a) através da técnica de PCR observaram a presença de espiroquetas nos canais radiculares.

*Bacteroides forsythus*, que é um bastonete Gram-negativo anaeróbio estrito de crescimento fastidioso, encontrado nas fases ativas da doença periodontal destrutiva (TANNER *et al.*, 1986), foi detectado nos canais radiculares infectados somente através de técnicas moleculares (PCR, sondas de DNA, captura imunomagnética) (CONRADS *et al.*, 1997; GONÇALVES & MOUTON, 1999; JUNG *et al.*, 2000).

*Slackia exigua* (antes *Eubacterium exiguum*), *Mogibacterium timidum* (antes *E. timidum*) e *Eubacterium saphenum*, bactérias difíceis de serem cultivadas, foram isoladas de canais radiculares com lesões periapicais por HASHIMURA *et al.* (2001) pelo método do PCR.

SIQUEIRA *et al.* (2000) examinando a microbiota de canais infectados com a utilização de métodos moleculares genéticos específicos encontraram uma predominância de *Bacteroides forsythus* (39%), *Haemophilus aphrophilus* (25%), *Corynebacterium*

*matruchotii* (27%), *Porphyromonas gingivalis* (17%) e *Treponema denticola* (17,9%). As espécies predominantemente encontradas foram diferentes de outros estudos e uma das prováveis razões para isto, segundo os autores, são os diferentes métodos de identificação utilizados.

O fastidioso *Mycoplasma* spp. (SERENE & ANDERSON, 1967) e o aeróbio *Candida* (SEN *et al.*, 1995; SIREN *et al.*, 1997; BAUMGARTNER *et al.*, 2000) foram também isolados dos canais radiculares.

As bactérias entéricas (*Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.) e *Pseudomonas* spp. não estão presentes comumente na microbiota de canais radiculares infectados, podendo entrar no canal radicular durante o tratamento endodôntico devido a um isolamento inadequado do campo de trabalho, a uma infiltração pelo material restaurador temporário, ou quando um canal é deixado erroneamente aberto para drenagem (SIREN *et al.*, 1997). Também foram isoladas de canais de dentes tratados endodonticamente com obturações deficientes e associados a lesões periapicais (PECIULIENE *et al.*, 2001).

#### **2.1.6. Os abscessos periapicais**

##### **a) Definição e diagnóstico clínico**

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

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

O diagnóstico clínico de abscesso dento-alveolar agudo caracteriza-se pelo súbito aparecimento de um quadro altamente sintomático, levando a incapacitação do paciente à sua rotina diária. Já, abscesso dento-alveolar crônico traduz quadros clínicos com baixa sintomatologia, e longa duração, não interferindo no dia a dia do paciente (CONSOLARO & RIBEIRO, 1998).

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

e linfócitos provocam resposta imune. Enquanto que, a presença de neutrófilos e macrófagos caracteriza o processo agudo.

### **b) Fases evolutivas patogênicas**

Uma das maneiras de se classificar os abscessos periapicais é principalmente quanto a sua localização clínica, podendo ser dividido em intra-oral e extra-oral. Os abscessos intra-orais podem ser encontrados na fase intra-óssea - primária, subperiosteal, submucosa (difusa ou localizada), fistulada e fênix e os extra-orais em difuso e localizado (SOUZA-FILHO *et al.*, 2002).

A fase intra-óssea primária caracteriza-se por apresentar a coleção purulenta circunscrita à região periapical avançando para os espaços medulares obedecendo ao princípio da menor resistência. Na fase subperiosteal a cortical óssea apresenta-se permeável à exsudação purulenta, por destruição da lâmina óssea cortical que se infiltra na interface periosteal/osso alveolar. Mesmo sem o rompimento do periosteal, os subprodutos bacterianos podem permear e agredir os tecidos moles adjacentes, resultando na formação de edema, mas sem pus. Já na fase submucosa, o pus se difunde pelos tecidos moles. Finalmente, na fistulização ocorre a proximidade do pus ao epitélio, provocando sua necrose e havendo drenagem espontânea para superfície perfurada. A fistulização do abscesso caracteriza a última fase patogênica que se estabelece no quadro clínico (CONSOLARO & RIBEIRO, 1998; SOUZA-FILHO *et al.*, 2002).

Contudo, DE DEUS (1992) divide as fases dos abscessos periapicais em aguda e crônica. No abscesso agudo, considera o pus confinado à região periapical como a fase intra-óssea. O pus procura caminho de menor resistência para sair e enquanto isto ocorre, produz um aumento de pressão sobre o pericementum causando, em pouco tempo, dor severa. Na continuidade do processo, o pus tenta perfurar o osso cortical e se acumula sob o periosteal, caracterizando a fase subperiosteal. Passa rapidamente pela fase submucosa e quando consegue exteriorizar-se o faz por meio da formação de uma fístula, havendo

diminuição ou desaparecimento da dor. A permanência deste quadro clínico por um tempo, passa a caracterizar um abscesso crônico, que é um processo supurativo crônico instalado na região do periápice, geralmente assintomático, podendo eventualmente evoluir para uma exacerbação aguda.

O abscesso fênix que é um abscesso localizado no ápice radicular em dentes com lesão periapical crônica, é uma condição clínica muito comum e geralmente ocorre pela agudização de uma lesão periapical crônica. É mais comum em dentes inferiores devido a maior espessura e resistência da cortical óssea vestibular. Esta agudização pode ocorrer devido ao desequilíbrio da resistência orgânica do hospedeiro com prevalência dos agentes agressores (bactérias). É uma condição aguda caracterizada pela presença de dor severa e ausência de edema intra ou extra-oral. Ausência de tumefação indica que o exsudato inflamatório não perfurou a cortical óssea do processo alveolar (GUTMANN & HARRISON, 1994), provocando aumento da pressão local, dor intensa e contínua. A maior dificuldade de drenagem via canal radicular ocorre muitas vezes devido à localização do pus que pela ação da força da gravidade fica depositada parte mais inferior da cavidade patológica e também devido a uma maior viscosidade do exsudato. Quando a tentativa de drenagem via canal radicular fracassa, a dor torna-se insuportável, sendo necessária uma intervenção cirúrgica com trefinação da cortical óssea vestibular para saída do exsudato purulento (NATKIN, 1974; SERENE *et al.*, 1978; PETERS, 1980; ANTRIM *et al.*, 1986).

### **c) Aspectos Clínicos**

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

A necrose pulpar faz parte do quadro clínico característico do abscesso periapical, mesmos nos casos cuja evolução se dá a partir de pericementites apicais por traumatismos acidentais e operatórios, movimentação dentária induzida ou oclusão

traumática. No entanto, a quase totalidade dos abscessos periapicais é resultante da evolução da cárie dentária até a necrose pulpar, com posterior envolvimento periapical pelas bactérias e seus produtos. É com o estabelecimento de microabscessos, observadas na microscopia óptica, que se diferencia a pericementite apical aguda do abscesso periapical agudo. Do ponto de vista clínico, distinguir precisamente este momento é impossível (CONSOLARO & RIBEIRO, 1998).

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

#### **d) Aspectos Radiográficos**

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

Em algumas situações, o abscesso periapical agudo é secundário a um granuloma ou a um abscesso crônico preexistentes. Nestes casos a imagem radiográfica quase sempre corresponde à lesão primária (CONSOLARO & RIBEIRO, 1998; SOUZA-FILHO *et al.*, 2002).

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

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

#### **e) Tratamento**

Como a causa da dor periapical de origem infecciosa é a presença de bactérias no interior do sistema de canais radiculares, o tratamento para esta condição é a eliminação ou redução da população bacteriana. Uma vez que as bactérias estão localizadas na porção apical do canal são as principais envolvidas na agressão aos tecidos perirradiculares, o ideal seria instrumentar progressivamente todo o canal radicular, colocar uma medicação intracanal e selar provisoriamente a cavidade. A desinfecção dos 2/3 coronários é justificada quando houver limitações anatômicas ou de tempo. Nos casos de abscessos perirradiculares, o tratamento varia de acordo com a intensidade da dor e localização da coleção purulenta. Quando existe dor severa e ausência de tumefação intra ou extra-oral, a coleção de exsudato ainda está restrita à região periapical e para se conseguir a drenagem é fundamental o completo debridamento dos canais e, às vezes, a trefinação do forame apical (SOUZA-FILHO *et al.*, 2002).

No entanto, quando existe tumefação intra-oral localizada no fundo de sulco vestibular, mesmo que pouco evidente, há necessidade de drenagem cirúrgica, devido

acúmulo de pus na região subperiosteal ou submucosa. A coleção do exsudato, distante da região periapical, embora sendo o efeito de uma infecção oriunda dos canais radiculares, torna-se neste momento a causa principal da dor e da toxicidade presente nos tecidos. A prioridade, portanto, antes mesmo da descontaminação do canal radicular é a remoção da coleção purulenta. A intervenção nos canais, nestes casos, poderá ser realizada tranqüilamente nas próximas 48 ou 72 horas após a drenagem do abscesso. Nesta ocasião, o paciente já estará sem dor, sem mobilidade dental, sem edema e sem o estresse presente no momento do atendimento inicial (SOUZA-FILHO *et al.*, 2002).

Portanto, a terapia para os abscessos periapicais basicamente consiste do debridamento do canal radicular e na maioria dos casos incisão e drenagem. A escolha é determinada pela severidade de sinais e sintomas e da necessidade de se estabelecer uma via adequada de drenagem (SOUZA-FILHO *et al.*, 2002).

A terapia antibiótica depende dos sinais sistêmicos e sintomas apresentados pelo paciente para reconhecer o momento em que o sistema imunológico encontra-se incompetente para combater a infecção. Quando os abscessos estão localizados e na ausência de linfadenite, celulite, trismo, febre e mal estar não há necessidade de terapia antibiótica (BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; ABBOTT, 1990; GRAD, 1997; ANDRADE, 2000). Posto que, antibióticos penetram pobremente em abscessos, é imperativo incisar e drenar o abscesso eliminando barreiras que possam impedir a difusão do antibiótico (SLOTS & PALLASCH, 1996).

DAILEY & MARTIN (2001) mostraram através de um levantamento com 1.011 questionários respondidos por pacientes atendidos em uma clínica de urgência, durante o período de 11 semanas, que o principal antibiótico prescrito foi a amoxicilina. A maioria dos pacientes atendidos tinha dor, com uma grande proporção apresentando infecções localizadas como pulpites ou abscessos localizados. Setenta e cinco por cento desses pacientes não receberam intervenção cirúrgica e foram prescritos antibióticos inapropriadamente.

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

#### **f) Complicações e conseqüências clínicas**

Não instituída a terapia adequada para o tratamento dos abscessos periapicais, estes podem evoluir para complicações e conseqüências clínicas indesejáveis, como por exemplo, osteomielite aguda e crônica purulenta, sinusite maxilar aguda e crônica, angina de Ludwig, periostite ossificante (CONSOLARO & RIBEIRO, 1998).

DE DEUS (1992) afirma que a difusão da infecção do abscesso periapical agudo, durante a sua fase evolutiva, depende de fatores como: a época em que se inicia o tratamento ou a drenagem, tipos de microrganismos envolvidos, estado geral do paciente, comprimento e situação anatômica do dente afetado no arco, espessura da lâmina cortical e inserções musculares (que podem determinar a rota tomada pela infecção em certos espaços dos tecidos).

#### **g) Microbiota**

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

A microbiota dos canais radiculares infectados tornou-se novamente tema de pesquisas após bactérias anaeróbias de pigmento negro serem isoladas de polpas dentais infectadas (incluindo as espécies de *Prevotella* e *Porphyromonas*), e da correlação destas bactérias com os aspectos clínicos tais como dor, mal odor, exsudato, formação de

abscessos, presença de fistula, entre outros (SUNDQVIST, 1976; YOSHIDA *et al.*, 1987; GOMES *et al.*, 1994a; GOMES, 1995; GOMES *et al.*, 1996a; GOMES 2002).

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

VAN STEENBERGEN *et al.* (1982) estudando a virulência das bactérias em monoculturas, relataram que *P. intermedia* causou abscessos localizados enquanto que *P. endodontalis* e *P. gingivalis* causaram apenas processos inflamatórios mais discretos. SUNDQVIST *et al.* (1989) afirmam que *P. gingivalis* está relacionada à produção e rápida disseminação de abscesso, enquanto *P. intermedia* e *P. endodontalis* causam abscessos localizados, sugerindo que a infecção mista do canal radicular com *P. intermedia*, *P. endodontalis* ou *P. gingivalis* aumenta o risco de se desenvolver uma inflamação purulenta apical. SIQUEIRA *et al.* (1998) observaram que nenhuma das bactérias testadas (*P. intermedia*, *P. nigrescens*, *P. endodontalis*, *F. nucleatum*, *F. necrophorum*) foram patogênicas isoladamente, com exceção da *P. gingivalis* que causou abscesso ulcerativo no subcutâneo do dorso dos ratos inoculados.

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

ADERHOLD *et al.* (1981) sugeriram que os *Streptococcus* spp. podem ser importantes nas fases iniciais da formação do abscesso, preparando o ambiente para subsequente invasão anaeróbia. LEWIS *et al.* (1986a) isolaram predominantemente

*Streptococcus* do grupo “*milleri*” em amostras obtidas no primeiro e segundo dia de sintomas clínicos de abscessos periapicais. Há também evidências que as bactérias *Streptococcus* do grupo “*milleri*” podem agir sinergicamente com as bactérias anaeróbias no desenvolvimento de abscessos (LEWIS *et al.*, 1988).

LEWIS *et al.* (1990), em uma revisão de literatura, afirmam que a microbiota dos abscessos periapicais agudo é freqüentemente polimicrobiana, envolvendo predominantemente *Streptococcus* dependentes de CO<sub>2</sub>, cocos Gram-positivos estritamente anaeróbios e bastonetes Gram-negativos estritamente anaeróbios.

BAUMGARTNER *et al.* (1999) analisaram 40 canais radiculares de dentes intactos com necrose pulpar e periodontite apical com o objetivo de estudar a correlação de bastonetes produtores de pigmento negro com os sinais e sintomas clínicos apresentados. Utilizaram métodos laboratoriais convencionais para identificação de bactérias produtoras de pigmento negro e *polymerase chain reaction*-PCR com primers específicos para os gens 16S r-RNA para diferenciar *Prevotella nigrescens* de *Prevotella intermedia*. Vinte e duas amostras (55%) foram positivas para as bactérias de pigmento negro. Destas, 11/22 foram identificadas como *P. nigrescens*, 8/22 como *P. intermedia*, 2/22 como *P. gingivalis* e 1/22 como *P. melaninogenica*. Dezesesseis dos 22 canais estavam associados com exsudato purulento, dos quais 9 apresentaram *Prevotella nigrescens* e 3 *Prevotella intermedia*, sendo que em 4 casos não detectaram crescimento microbiano viável. Análise estatística dos resultados não encontrou relação significativa da presença de bactérias de pigmento negro com sinais e sintomas clínicos. Posteriormente, alguns pesquisadores da mesma equipe clonaram e sequenciaram os gens 16S rRNA de bactérias de pigmento negro que não haviam sido identificados no laboratório e determinaram que pertenciam a espécie *Prevotella tanneriae*.

SOUSA (2000) investigou 30 canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais quanto a composição microbiana, confirmando a presença de uma microbiota mista, composta principalmente de *Peptostreptococcus prevotii*, *P. micros* e *F.*

*necrophorum*. A autora não encontrou nenhuma associação estatisticamente significativa entre a presença de abscessos periapicais com qualquer das espécies bacterianas estudadas. Foram diagnosticados 2 abscessos na fase intra-óssea, 5 na fase subperiosteia, 17 na fase submucosa, sendo 13 difusos e 4 localizados e 6 na fase de fistulização, 5 com fistula intra-oral e 1 extra-oral. Estes resultados sugerem a prevalência dos abscessos submucosos. Também em 2000, SOUSA *et al.* isolaram microrganismos presentes em 20 canais radiculares com exsudato purulento e a sua possível correlação com a patogenia desse processo inflamatório. Observaram a prevalência de *Peptostreptococcus micros* (50%), *Fusobacterium necrophorum* (30%), *Streptococcus sanguis* (30%), *Fusobacterium nucleatum* (25%), *Streptococcus constellatus* (20%), *Porphyromonas endodontalis* (15%). Não obtiveram correlação estatisticamente significativa entre qualquer espécie e exsudato purulento. Concluíram que canais radiculares com exsudato purulento apresentam microbiota mista.

OLIVEIRA *et al.* (2000) avaliaram a ocorrência de *P.endodontalis* em infecções assintomáticas e sintomáticas. Estudaram 44 canais radiculares com polpas necrosadas, sendo 6 diagnosticados como abscesso periapical agudo. *P.endodontalis* foi detectada em 4/6 (66.7%) canais radiculares com abscesso periapical. Entretanto, a alta prevalência de *P. endodontalis* em abscessos perirradiculares agudos sugere que esta bactéria tem potencial para ser um importante patógeno endodôntico.

SIQUEIRA *et al.* (2001a) utilizaram PCR para detectar *Treponema denticola* em canais radiculares de 54 dentes com polpa necrosada. *T. denticola* foi detectada em 5/10 casos diagnosticados como abscesso perirradicular agudo.

SIQUEIRA *et al.* (2001b) analisaram o pus coletado de 10 casos com abscessos perirradiculares agudos. Utilizaram PCR para detectar a ocorrência de 4 bastonetes anaeróbios formadores de pigmento negro (*Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens*), *Treponema denticola* e *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Bastonetes anaeróbios formadores de pigmento

negro estavam presentes em 80% dos abscessos examinados, *P. endodontalis* foi encontrada em 70%, *T. denticola* em 50%, *P. gingivalis* em 40% e *P. intermedia* em 10%. *P. gingivalis* estava sempre associada à *P. endodontalis*. *P. nigrescens* e *A. actinomycetemcomitans* não foram encontrados em nenhuma amostra de pus. Os autores concluíram que *P. endodontalis*, *T. denticola* e *P. gingivalis* podem ter um papel importante na etiologia dos abscessos perirradiculares agudos.

SIQUEIRA *et al.* (2001c) avaliaram a microbiota de 27 abscessos perirradiculares pelo método de hibridização de DNA\_DNA. As amostras foram obtidas por aspiração e observaram a ocorrência de 49 espécies bacterianas. As espécies mais prevalentes encontradas foram *Bacteroides forsythus* (29,6%), *Porphyromonas gingivalis* (29,6%), *Streptococcus constellatus* (25,9), *Prevotella intermedia* (22,2%), *Prevotella nigrescens* (22,2%), *Fusobacterium periodonticum* (18,5%), *Fusobacterium nucleatum* (18,5%) e *Eikenella corrodens* (18,5%).

GOMES (2002) investigou a microbiota de 100 canais radiculares infectados sendo que destes 44 estavam associados com abscessos periapicais. Encontrou associação significativa entre abscesso periapical com a presença de anaeróbios tais como *Peptostreptococcus micros*, *P. prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* ( $p < 0,01$ ) (Tab. 5.2.11.). Foram diagnosticados 5 abscessos na fase intra-óssea, 5 na fase subperiosteia, 22 na fase submucosa, sendo 18 difusos e 4 localizados e 12 na fase de fistulização, 11 com fistula intra-oral e 1 extra-oral. Observaram a prevalência dos abscessos submucosos.

Na microbiota de canais radiculares associados com abscessos periapicais (TAB. 2), os gêneros mais comumente isoladas são os *Streptococcus* e os gêneros relacionados *Enterococcus* e *Gemella*, e os anaeróbios estritos como *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, *Prevotella* (entre elas *Prevotella tanneriae* e *P. nigrescens*), *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Eubacterium*. Os gêneros *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Veillonella* também têm sido encontrados freqüentemente. Outros como *Propionibacterium*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Capnocytophaga*, *Tissierella*, *Campylobacter*, *Actinobacillus* e

*Staphylococcus* são também isolados. Atualmente têm-se detectado espécies como *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides forsythus*, *Fusobacterium periodonticum*, *Eikenella corrodens* (SABISTON *et al.*, 1976; ADERHOLD *et al.*, 1981; OGUNTEBI *et al.*, 1982; LABRIOLA *et al.*, 1983; WILLIAMS *et al.*, 1983; WASFY *et al.*, 1992; KULEKÇI *et al.*, 1996; BAUMGARTNER *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2000; SOUSA, 2000; SOUSA *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2001a,b,c; GOMES, 2002) (TAB. 2).

TABELA 2  
Bactérias comumente isoladas de abscessos periapicais.

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

## 2. Análise da suscetibilidade antimicrobiana

### 2.2.1. Antibióticos – mecanismo de ação e resistência

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas por microrganismos vivos ou por processos semi-sintéticos. Têm a propriedade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e, eventualmente, destruí-los (ANDRADE, 2000).

Em 1936 as sulfonamidas foram introduzidas, contudo os antibióticos tornaram-se disponíveis apenas em 1942 com a introdução da penicilina na prática médica. Os antibióticos são derivados principalmente de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*, de actinomicetos dos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora* e de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Nocardia* e *Pseudomonas* (antibióticos naturais). Antibióticos semi-sintéticos são aqueles obtidos em laboratório, por intermédio do acréscimo de radicais ao núcleo ativo, isolado no meio de cultura em que se produz o antibiótico original (ex. amoxicilina e cefalosporinas). Já os antibióticos biossintéticos são os obtidos em cultura de microrganismos a que se adicionam substâncias químicas capazes de alterar a estrutura molecular (ex. cloranfenicol) (AMATO-NETO *et al.*, 2000).

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com vários critérios, por exemplo, segundo a estrutura química: antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas), macrolídeos (eritromicina, azitromicina), lincosaminas (clindamicina).

Dependendo do antibiótico há vários mecanismos de ação agindo na célula bacteriana, como inibição da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana celular, alteração na síntese de componentes celulares e inibição do metabolismo.

Microrganismos podem muitas vezes apresentar-se resistentes ou não serem afetados por um antibiótico. A resistência usualmente resulta da inativação do antibiótico

TABELA 2  
Bactérias comumente isoladas de abscessos periapicais.

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

## 2. Análise da suscetibilidade antimicrobiana

### 2.2.1. Antibióticos – mecanismo de ação e resistência

Os antibióticos são substâncias químicas produzidas por microrganismos vivos ou por processos semi-sintéticos. Têm a propriedade de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e, eventualmente, destruí-los (ANDRADE, 2000).

Em 1936 as sulfonamidas foram introduzidas, contudo os antibióticos tornaram-se disponíveis apenas em 1942 com a introdução da penicilina na prática médica. Os antibióticos são derivados principalmente de fungos dos gêneros *Penicillium* e *Cephalosporium*, de actinomicetos dos gêneros *Streptomyces* e *Micromonospora* e de bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Nocardia* e *Pseudomonas* (antibióticos naturais). Antibióticos semi-sintéticos são aqueles obtidos em laboratório, por intermédio do acréscimo de radicais ao núcleo ativo, isolado no meio de cultura em que se produz o antibiótico original (ex. amoxicilina e cefalosporinas). Já os antibióticos biossintéticos são os obtidos em cultura de microrganismos a que se adicionam substâncias químicas capazes de alterar a estrutura molecular (ex. cloranfenicol) (AMATO-NETO *et al.*, 2000).

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com vários critérios, por exemplo, segundo a estrutura química: antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas), macrolídeos (eritromicina, azitromicina), lincosaminas (clindamicina).

Dependendo do antibiótico há vários mecanismos de ação agindo na célula bacteriana, como inibição da síntese da parede celular, alteração da permeabilidade da membrana celular, alteração na síntese de componentes celulares e inibição do metabolismo.

Microrganismos podem muitas vezes apresentar-se resistentes ou não serem afetados por um antibiótico. A resistência usualmente resulta da inativação do antibiótico

por enzimas bacterianas, desenvolvimento de vias metabólicas alternativas não afetadas por antibióticos ou alterações bioquímicas na bactéria que impeçam a penetração ou ligação do antibiótico (NISENGARD & NEWMAN, 1994).

A ineficácia do antibiótico resulta não apenas da resistência, mas também de uma terapia inadequada que não consegue controlar um grande número de microrganismos. Em outras vezes, baixas doses de antibióticos apenas destroem os microrganismos mais suscetíveis, permitindo a sobrevivência dos mais resistentes. Desta forma, é imperativo que a dose inicial do antibiótico e o tempo da terapia sejam suficientes para o sucesso do tratamento. Finalmente, os antibióticos podem ser ineficazes se sofrerem ação antagonística de outras drogas ministradas concomitantemente (NISENGARD & NEWMAN, 1994).

Os antibióticos podem ser bacteriostáticos (quando inibem o crescimento e multiplicação do microrganismo) ou bactericidas (quando causa a morte do microrganismo). Porém, nenhum antibiótico é eficaz contra todos os microrganismos encontrados nas infecções orais. Assim, apresentam um espectro estreito, aqueles que afetam poucas espécies de microrganismos e amplo, aqueles que agem sobre uma grande variedade de microrganismos.

Antibióticos sistêmicos devem ser administrados com precauções devido às possibilidades de reações alérgicas, toxicidade, efeitos colaterais e desenvolvimento de espécies resistentes. Além disso, na odontologia, os antibióticos sistêmicos não conseguem atingir bactérias confinadas no tecido pulpar necrótico e nem alcançar aquelas que se encontram dentro de abscessos periapicais. Assim, a mais importante manobra em qualquer infecção é o debridamento e a drenagem. Se o pus permanecer, antibióticos são freqüentemente inefetivos quanto à presença de microrganismos sensíveis. Os antibióticos são incapazes de alcançar o sítio de infecção devido a pobre vascularização na parede de um abscesso, presença das enzimas bacterianas e também pelo baixo potencial óxido-redução e baixo pH encontrado em abscessos (TALLY,1978). Outro fato é que algumas bactérias provavelmente encontram-se quiescentes no interior dos abscessos, devido as

condições inadequadas para a proliferação bacteriana, de maneira que a maioria dos antibióticos não conseguem atingi-las, pois estes atuam durante a divisão celular (ANDRADE, 2000).

Portanto, a terapia antibiótica não está indicada em casos de pulpíte e, não é necessariamente efetiva em casos de abscessos periapicais agudos apresentando edema localizado ou presença de fistula. Para essas situações clínicas o sucesso é obtido pelo adequado debridamento do canal radicular, drenagem dos tecidos moles quando necessário, ou ainda em algumas vezes, pela extração do dente (BARKER & QUALTROUGH, 1987; BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; ABBOTT *et al.*, 1990).

A terapia antimicrobiana é indicada nos casos de infecções endodônticas que apresentem sinais e sintomas de disseminação do processo infeccioso, tais como febre, mal estar, celulite ou trismo inexplicável ou na profilaxia antibiótica de pacientes de risco durante a terapêutica endodôntica (BERGENHOLTZ & CRAWFORD, 1989; ABBOTT *et al.*, 1990; GRAD, 1997; ANDRADE, 2000). Embora antibióticos de uso sistêmico não sejam normalmente utilizados no tratamento de doenças crônicas, em pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana tornam-se importante complemento à terapêutica endodôntica, sendo utilizados em regimes profiláticos (ABBOTT *et al.*, 1990; GRAD, 1997).

Os antibióticos foram também utilizados como medicamento intracanal a partir de 1944 por Adams que foi o primeiro a aconselhar o uso da chamada “droga milagrosa” em endodontia. A indicação dos antibióticos para esse uso era baseada no conceito de que eles são efetivos contra os microrganismos no interior dos túbulos dentinários, nas irregularidades dos canais, canais acessórios, canais laterais e nos tecidos periapicais, porém, não são adequados para o uso de pequeno período de tempo como solução irrigadora (ABBOTT *et al.*, 1990). Grossman desenvolveu em 1951 uma associação chamada de PBSC que consistia de penicilina, bacitracina, estreptomicina juntamente com um fungicida, o caprilato de sódio. Essa associação foi posteriormente retirada de uso

clínico por determinação da Administração de Alimentos e Drogas em 1971. Atualmente, os antibióticos têm sido pouco empregados como medicação intracanal, devido ao risco de haver sensibilização do paciente ou desenvolvimento de resistência bacteriana. Outra razão é que os antibióticos não são superiores aos anti-sépticos comuns como curativo intracanal (SIQUEIRA, 1996).

TABELA 3  
Antibióticos utilizados na odontologia.

AÇÃO	
BACTERIOSTÁTICA	BACTERICIDA
Azitromicina	Penicilina G
Eritromicina	Penicilina V
Clindamicina	Ampicilina
	Amoxicilina
	Cefalosporina
	Metronidazol

#### a) Penicilinas

As penicilinas, como um grupo, são os agentes antimicrobianos mais freqüentemente utilizados, e constituem a primeira opção como coadjuvante no tratamento das infecções odontológicas leves ou moderadamente severas, e na prevenção da endocardite bacteriana (GREENBERG *et al.*, 1979; MOENNING *et al.*, 1989; ABBOTT *et al.*, 1990; BAKER & FOTOS, 1994; SANDS *et al.*, 1995; ANDRADE, 2000).

Devido à presença de um anel  $\beta$ -lactâmico em sua estrutura química as penicilinas junto com as cefalosporinas fazem parte do grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. São compostos naturais e semi-sintéticos, com propriedades diferentes no que diz respeito à sua ação antibacteriana. Apresentam em comum, como núcleo molecular, o ácido 6-aminopenicilânico. Podem apresentar pequeno ou largo espectro de ação biológica (WALKER, 1992; ANDRADE, 2000).

São drogas bactericidas cujo principal mecanismo de ação é inibir a síntese da parede celular de algumas bactérias. São largamente distribuídas no organismo e rapidamente eliminadas do plasma pelos rins. Sua toxicidade é extremamente baixa e exceto por reações alérgicas, são as drogas conhecidas mais seguras.

As penicilinas naturais (denominadas assim por serem produzidas por fungos), são também conhecidas por benzilpenicilina ou penicilina G, apresentam um estreito, porém útil, espectro de atividade. É indicada para a sensibilidade de microrganismos tais como *Streptococcus pyogenes*, estreptococos do grupo *viridans*, *Peptostreptococcus* spp., *Actinomyces israelii*, e bactérias do gênero *Clostridium*, sendo para estes, bactericida. Enquanto que para *Enterococcus* spp., a atividade da penicilina G é bacteriostática (AMATO-NETO *et al.*, 2000). São muito mal absorvidas por via oral por serem inativadas pelo suco gástrico. As vias parenterais (intramuscular ou intravenosa) permitem uma completa absorção, apesar de aumentar a possibilidade de reação alérgica (ANDRADE, 2000). Sua concentração sangüínea para uma injeção de 1.000.000 UI intramuscular é de 8 µg/mL.

As penicilinas naturais não agem, em doses usuais, contra espécies produtoras de penicilinases ( $\beta$ -lactamases), que são enzimas produzidas por determinadas espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que têm a propriedade de destruir o anel  $\beta$ -lactâmico de algumas penicilinas, convertendo-as em ácido penicilínico, que não apresenta atividade antimicrobiana (ANDRADE, 2000).

A penicilina V ou fenoximetilpenicilina potássica é obtida por meio de modificações da cadeia lateral do ácido 6-aminopenicilânico, gerando inúmeras outras penicilinas chamadas de semi-sintéticas. Destas, a ampicilina e seu análogo, amoxicilina, são as únicas de interesse para a odontologia. A penicilina V apresenta no pico da dose de 500.000UI aproximadamente 325mg de 6 em 6 horas, uma concentração sangüínea de 6µg/mL.

As penicilinas semi-sintéticas são resistentes ao ácido gástrico, permitindo a administração por via oral. Seu espectro de ação é idêntico ao das penicilinas G, entretanto devido sua melhor absorção oral resulta em maior aplicação clínica (WALKER, 1992; ANDRADE, 2000). Também não agem contra espécies bacterianas produtoras de penicilinases ( $\beta$ -lactamase).

Apesar de apresentarem o mesmo espectro de ação, a ampicilina e a amoxicilina diferem quanto às características farmacológicas. A amoxicilina é mais bem absorvida por via oral e não sofre modificações no organismo. Sua concentração no soro e nos tecidos é quase duas vezes maior que a da ampicilina (WALKER, 1992; ANDRADE, 2000). Apresentam concentração sanguínea de 4  $\mu\text{g/mL}$  para 500 mg de ampicilina de 8 em 8 horas e para amoxicilina 7  $\mu\text{g/mL}$  para a dose de 500mg de 8 em 8 horas. Ambas apresentam espectro de ação estendido, por inibir a maioria das bactérias sensíveis às penicilinas G e V, e ter ação adicional contra bactérias Gram-negativas, especialmente espécies de *Hemophilus influenzae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*. A amoxicilina não é totalmente efetiva contra bactérias cocos Gram-positivos e, como a penicilina G e V, é também destruída pela maioria das bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases (MOENNING *et al.*, 1989; WALKER, 1992; BAKER & FOTOS, 1994).

A ação da penicilinase tem sido superada com a combinação da amoxicilina com o clavulanato de potássio (sal potássico do ácido clavulânico), produto de um estreptomiceto. O clavulanato de potássio é um inibidor não competitivo da penicilinase sem qualquer atividade antimicrobiana. A formulação de amoxicilina combinada com esse potente inibidor de  $\beta$ -lactamase (clavulanato de potássio), tem mostrado atividade contra anaeróbios estritos penicilinase-resistente (GOLDESTEIN & CITRON, 1986; LEWIS *et al.*, 1993) e prevenindo a destruição de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos administrados simultaneamente (MOENNING *et al.*, 1989). Apresenta uma concentração sanguínea para a dose de 500mg de 8 em 8 horas, de 7  $\mu\text{g/mL}$ , composto de 500mg de amoxicilina para 125mg de clavulanato de potássio.

As penicilinas têm sido recomendadas como antibióticos de escolha no tratamento de infecções odontogênicas agudas em crianças (HILL-SMITH & SCHUMAN, 1983). Sendo que a penicilina G e a V, devido a sua efetividade histórica, mínima toxicidade e relativamente baixo custo, são a principal escolha no tratamento das infecções odontogênicas. Um pequeno curso de alta dose de amoxicilina tem mostrado eficiência tanto como a penicilina convencional na redução de edema em 24 horas, porém, nenhuma outra diferença foi encontrada (LEWIS *et al.*, 1986b). Por outro lado em 1993, PATERSON e CURZON afirmaram que o regime de pequeno curso e alta dose de amoxicilina parece ter vantagens sobre o regime convencional de penicilina para o tratamento de infecções odontogênicas. Tornando assim, a prescrição medicamentosa na odontologia diferente da medicina, pois esta depende principalmente da resposta de defesa do organismo. Já na odontologia o fator mais importante é a remoção da causa (ex. um eficiente preparo químico-mecânico de um canal radicular infectado, combatendo as bactérias e neutralizando e removendo seus produtos). A terapia antibiótica na odontologia depende dos sinais sistêmicos e sintomas apresentados pelo paciente para reconhecer o momento em que o sistema imunológico encontra-se incompetente para combater a infecção.

Embora as penicilinas sejam consideradas como primeira escolha para o tratamento de infecções odontogênicas, o seu uso indiscriminado tem levado ao surgimento de bactérias resistentes tornando-se um problema de grande significância clínica. APPELBAUM *et al.* (1990a) estudaram a suscetibilidade antimicrobiana de 320 *Bacteroides* não pertencentes ao grupo *B. fragilis* (*Prevotella* e *Porphyromonas*) e 129 espécies do gênero *Fusobacterium*. Observaram a presença de espécies de *Prevotella* e *Porphyromonas* resistentes à penicilina e que o ácido clavulânico aumentou significativamente a atividade antimicrobiana da amoxicilina. Concluíram que, embora a resistência às penicilinas tenha aumentado, estas associadas a inibidores de  $\beta$ -lactamase continuam efetivas contra as bactérias estudadas.

Em uma revisão de literatura JOHNSON (1993) relata que o número de espécies bacterianas capazes de produzir  $\beta$ -lactamase tem aumentado no decorrer dos anos. Espécies pertencentes aos gêneros *Bacteroides* (outras espécies além do *Bacteroides fragilis*), *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium* têm demonstrado resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

LEWIS *et al.* (1995) encontraram em 78 pacientes dos quais 43 receberam antibioticoterapia dentro de 6 meses antes do desenvolvimento do estudo, um total de 331 espécies bacterianas sendo 143 anaeróbios facultativos e 188 anaeróbios estritos. Setenta e cinco isolados mostraram-se resistentes a benzilpenicilina, 37 a ampicilina e 16 espécies foram resistentes a amoxicilina combinada com ácido clavulânico, utilizando o método do *E-test*. Nas amostras de quarenta e três pacientes, pelo menos um isolado resistente a penicilina foi encontrado e dentro deste grupo, 30 das infecções continham pelo menos 1 espécie bacteriana que produziu  $\beta$ -lactamase. Estes autores ainda afirmaram que a história de terapia antibiótica durante os seis meses anteriores ao desenvolvimento do estudo não influenciou o isolamento de bactérias penicilina resistentes. Concluíram que bactérias penicilina resistentes são freqüentemente encontradas na microbiota de infecção odontogênica aguda.

## **b) Cefalosporinas**

Estes antibióticos são derivados semi-sintéticos de um fungo, *Cephalosporium acremonium*, e são estruturalmente relacionados à penicilina. Apresentam, em comum, em sua estrutura química, como núcleo molecular, o ácido 7-aminocefalosporínico. Junto com as penicilinas, fazem parte do grupo de antibióticos denominados  $\beta$ -lactâmicos, porém são menos sensíveis à ação das enzimas  $\beta$ -lactamases (ANDRADE, 2000).

As cefalosporinas são bactericidas e inibem a síntese da parede celular bacteriana de forma similar à penicilina. Apresentam um amplo espectro e são eficazes contra muitos microrganismos Gram-positivos, incluindo estafilococos. Bactérias Gram-

negativas como *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* também são sensíveis as cefalosporinas. Muitas cefalosporinas são distribuídas amplamente pelo organismo e a maior parte da dose administrada é excretada de forma inalterada na urina (NISENGARD & NEWMAN, 1994). Apresenta uma concentração sangüínea de 17 µg/mL para a dose de 500mg de 8 em 8 horas (de maneira geral, pois as cefalosporinas constituem-se de várias gerações de antibióticos).

A incidência de reações alérgicas é quase tão alta quanto com a penicilina, embora, pacientes alérgicos a penicilina podem não ser às cefalosporinas. Contudo, pode-se observar hipersensibilidade cruzada entre cefalosporinas e penicilinas (PALLASCH, 1979; MILES, 1984).

A eficácia das cefalosporinas de uso oral contra anaeróbios estritos é limitada, com exceção do cefaclor (segunda geração). Além disso, sua penetração em tecido ósseo é reduzida (com exceção do cefaclor), e são mais caras e menos eficazes que a amoxicilina (BAKER & FOTOS, 1994; SIQUEIRA, 1997). Contudo, FAZAKERLEY *et al.* (1993) compararam a eficácia da cefalosporina de 1º geração – cephadrine -, amoxicilina e fenoximetilpenicilina no tratamento de infecções dentoalveolares agudas e observaram que todos os antibióticos testados foram efetivos na resolução da infecção. Afirmaram que a cefalosporina testada parece ser uma escolha adequada para o tratamento de infecções dentoalveolares agudas em conjunto com apropriado tratamento cirúrgico (drenagem).

CUMMING *et al.* (1984) avaliaram o papel da cefalosporina de 1º geração – cefadroxil - no tratamento das infecções orofaciais agudas. Os autores sugeriram que a cefadroxil pode ser incluída na lista de possíveis drogas utilizadas para esses casos.

Segundo ANDRADE (2000) as cefalosporinas não apresentam nenhuma grande vantagem sobre as penicilinas, embora tenha um espectro de ação um pouco aumentado, este não coincide com as bactérias envolvidas nas infecções orais.

KURIYAMA *et al.* (2000) investigaram os aspectos bacteriológicos e a suscetibilidade antimicrobiana de infecções orofaciais e observaram que as cefalosporinas testadas exerceram grande atividade contra estreptococos do grupo *viridans*, *Peptostreptococcus* spp., *Porphyromonas* spp., e *Fusobacterium* spp.. Contudo, espécies de *Prevotella* pigmentadas e não pigmentadas não mostraram total suscetibilidade a cefalosporina (cefazolim). Enquanto que o cefmetazol foi ativo contra todas as bactérias testadas. Entretanto, o alto custo ou a inconveniência da administração intravenosa pode impedir o uso freqüente em infecções odontogênicas.

### **c) Macrolídeos**

São drogas obtidas por meio de cultura de *Streptomyces erythreus*, sendo que a eritromicina é a substância base e a claritromicina e a azitromicina são derivados semi-sintéticos recentes (CHAMBERS & SANDE, 1996).

Os macrolídeos são um grupo de antibióticos que apresentam em comum na sua estrutura química um anel lactônico de 15 átomos. Este grupo inclui a eritromicina e outras drogas relacionadas quimicamente com a eritromicina como a claritromicina e roxitromicina (ANDRADE, 2000). A azitromicina difere dessas drogas pela inserção de apenas um átomo de nitrogênio no anel lactônico de 15 átomos, o que parece conferir a essa droga mudanças em algumas características farmacocinéticas como uma meia-vida plasmática biológica bastante prolongada nos tecidos e um maior espectro de ação (CHAMBERS & SANDE, 1996; ANDRADE, 2000).

São agentes bacteriostáticos que inibem a síntese protéica através de ligação reversível com as subunidades ribossômicas 50S de microrganismos sensíveis (BRISSON-NOEL *et al.*, 1988). Geralmente em infecções odontológicas baixas doses são bacteriostáticas e altas doses são bactericidas (NISENGARD & NEWMAN, 1994). Apresentam uma concentração sanguínea de 1 µg/mL para a eritromicina na dose de 500mg

de 6 em 6 horas, e para azitromicina a concentração de 0,4 µg/mL após uma dose única diária de 500mg.

Apresentam uma baixa toxicidade, porém a icterícia colestática, sinal de toxicidade hepática, pode se manifestar durante o tratamento com a eritromicina (MILES, 1984; CHAMBERS & SANDE, 1996; ANDRADE, 2000).

A eritromicina difunde-se rapidamente através do organismo sendo concentrada no fígado e excretada na bile, urina e fezes. Embora os rins removam a eritromicina do corpo, mecanismos não-renais são mais importantes (NISENGARD & NEWMAN, 1994). Apresenta espectro de ação similar ao das penicilinas G e V, com ação contra a maioria dos cocos Gram-positivos e a maioria das bactérias anaeróbias orais (MOENNING *et al.*, 1989; SANDS *et al.*, 1995). Porém, muitas bactérias anaeróbias e aeróbias têm desenvolvido resistência a essa droga (BAKER *et al.*, 1985; CULLMANN *et al.*, 1993; BAKER & FOTOS, 1994; CHAMBERS & SANDE, 1996). A maioria das bactérias Gram-negativas apresenta resistência intrínseca a eritromicina devido à sua incapacidade de penetrar no complexo membrana externa e parede celular. A resistência adquirida pode ser mediada por plasmídeos que codificam uma alteração no sítio de ligação na subunidade 50S ou por enzimas que inativam a eritromicina (WALKER, 1992).

BAKER *et al.* (1985) investigando a suscetibilidade de bactérias anaeróbias da cavidade oral humana contra diversos antibióticos, isolaram 139 amostras bacterianas anaeróbias estritas e facultativas. Observaram que todos os grupos bacterianos estudados apresentaram espécies resistentes a eritromicina, compreendendo espécies de *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, "*Bacteroides oralis*", *Campylobacter* spp., *Eikenella corrodens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Veillonella parvula*.

Em 1978, HUNT *et al.*, relataram que aproximadamente 50% das espécies de *Streptococcus* e *Staphylococcus* isoladas de infecções orais foram resistentes a eritromicina.

PETERS *et al.* (1992) relataram que embora a azitromicina possa apresentar menor atividade do que a eritromicina *in vitro* contra os microrganismos Gram-positivos, clinicamente, as concentrações da azitromicina nos tecidos são superiores ao da eritromicina. Após administração oral, as concentrações sanguíneas da azitromicina são menores que a eritromicina, porém isso reflete a rápida movimentação da droga, da circulação para os compartimentos intracelulares, resultando em maior concentração tissular do que comumente vista com a eritromicina. Entretanto, a desvantagem potencial da baixa concentração sanguínea da azitromicina está relacionada a bacteremia que pode ocorrer em pacientes que estão comprometidos severamente. Contudo, os autores afirmaram que a concentração tissular é mais importante que a sérica para o tratamento de infecções.

CULLMANN *et al.* (1993) avaliando a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias anaeróbias, relataram que a eritromicina não foi eficaz contra *Bacteroides* spp. e *Fusobacterium* spp.. Os autores observaram que até mesmo algumas espécies Gram-positivas apresentaram resistência, entre elas *Peptostreptococcus* spp. e *Propionibacterium* spp..

Segundo FASS (1993) a azitromicina apresenta-se mais ativa contra espécies Gram-negativas, como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Pasteurella multocida* e *Fusobacterium* spp. e menos ativa contra *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. As drogas azitromicina, eritromicina e claritromicina obtiveram equivalente atividade contra *Staphylococcus* spp. e Gram-positivos anaeróbios. Nenhuma das três drogas foram particularmente ativas contra membros da família *Enterobacteriaceae* ou bacilos Gram-negativos não-fermentativos, embora a concentração de 4µg/mL de azitromicina inibiu algumas espécies, o que presumivelmente deve-se a uma melhor penetração da droga através da membrana externa e parede celular. Ainda, o autor verificou que embora a atividade antibacteriana dessas drogas possa variar de microrganismo para microrganismo, como regra geral, os microrganismos que foram relativamente sensíveis a um antibiótico, foram também relativamente sensíveis aos demais, assim como, microrganismos resistentes

a um antibiótico, também apresentaram resistência-cruzada aos outros, com exceção do *Fusobacterium* que se mostrou sensível somente a azitromicina.

Devido ao aparecimento cada vez maior de espécies resistentes a eritromicina, provavelmente esta será substituída pelos novos compostos do grupo (claritromicina, azitromicina), apesar do custo destes antibióticos ser mais elevado. Porém, até o momento não existe um número suficiente de trabalhos na área odontológica, que permita avaliar a relação risco/benefício destes antimicrobianos no tratamento das infecções odontogênicas (ANDRADE, 2000).

Classicamente, a eritromicina tem-se constituído em alternativa para a benzilpenicilina e a penicilina V, em pacientes alérgicos. No entanto, a frequência de falhas terapêuticas está sendo relativamente alta. Assim, nos últimos anos, a eritromicina tem sido substituída pela claritromicina ou pela azitromicina no tratamento de infecções leves e moderadas. Uma vez que, a azitromicina parece apresentar um espectro de ação um pouco mais amplo que a eritromicina em relação às bactérias Gram-negativas (ANDRADE, 2000).

#### **e) Lincosaminas**

Deste grupo, a clindamicina é a única que apresenta indicação em odontologia, sendo derivada quimicamente da lincomicina (droga padrão do grupo). Ela é um dos antibióticos mais eficazes contra infecções odontogênicas graves (MOENNING *et al.*, 1989; BAKER & FOTOS, 1994; GRAD, 1997; ANDRADE, 2000).

A clindamicina é muito bem absorvida por via oral e atravessa facilmente as barreiras teciduais, apresentando a propriedade de penetrar no interior dos macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, o que explica a alta concentração desta droga em abscessos. É biotransformada pelo fígado e excretada na bile (CHAMBERS & SANDE, 1996; ANDRADE, 2000).

O mecanismo de ação da clindamicina é similar àquele apresentado pelos macrolídeos, inibindo a síntese protéica bacteriana, através da ligação aos ribossomos 50S. Age de forma bacteriostática, mas, em altas doses, pode ser bactericida (MOENNING *et al.*, 1989; WALKER, 1992; RASMUSSEN *et al.*, 1993; CHAMBERS & SANDE, 1996; ANDRADE, 2000). Apresenta uma concentração sanguínea de 5 µg/mL para a dose de 300mg de 8 em 8 horas.

Devido à sua capacidade de penetrar no osso, a clindamicina é particularmente útil no tratamento da osteomielite. É a droga de escolha para infecções graves causadas por microrganismos anaeróbios e para pacientes alérgicos a penicilina (KURIYAMA e al., 2000).

O mais severo efeito colateral é a colite pseudomembranosa, que ocorre por desequilíbrio da microbiota intestinal e proliferação de *Clostridium difficile* (MILES, 1984; BAKER & FOTOS, 1994). Muitos antibióticos têm sido associados à colite pseudomembranosa (incluindo penicilina, ampicilina, cefalosporinas, tetraciclina, cloranfenicol, e estreptomicina) mas a incidência parece ser mais alta com a clindamicina (PALLASCH, 1979; BAKER & FOTOS, 1994).

Essa droga é ativa contra a maioria das bactérias Gram-positivas, entre espécies anaeróbias estritas e facultativas, inclusive o *Staphylococcus aureus* e outras espécies produtoras de β-lactamase. A clindamicina é também ativa particularmente contra quase todos os anaeróbios Gram-negativos, incluindo o *Bacteroides fragilis* (MOENNING *et al.*, 1989; WALKER, 1992; SANDS *et al.*, 1995; ANDRADE, 2000). Porém, as bactérias Gram-negativas aeróbias não são sensíveis a clindamicina (WALKER, 1992; CHAMBERS & SANDE, 1996).

GILL & PALLASCH (1981) afirmam que devido ao uso da clindamicina estar associado a efeitos adversos sérios, como a colite pseudomembranosa, esta deve ser reservada para as infecções odontogênicas graves, com microrganismos anaeróbios e nos

casos onde o tratamento não respondeu adequadamente aos antibióticos de primeira escolha, normalmente as penicilinas (WALKER, 1992; ANDRADE, 2000). Segundo MOENNING *et al.* (1989) e BAKER & FOTOS (1994) a clindamicina continua sendo uma droga efetiva contra a maioria dos microrganismos envolvidos nas infecções odontogênicas por ter o seu uso limitado. Contudo, WEXLER *et al.* (1991) avaliando *in vitro* a atividade da clindamicina, entre outros antibióticos, contra bactérias anaeróbias, encontraram espécies de *Bacteroides*, *Clostridium* e *Peptostreptococcus* resistentes. Enquanto que, APPELBAUM *et al.* (1992) investigando a suscetibilidade de 540 bacilos Gram-negativos anaeróbios, observaram que a clindamicina foi ativa contra 90% das espécies testadas. Autores como RASMUSSEN *et al.* (1993) e FORBES *et al.* (1998) afirmam que existem 3 mecanismos de resistência bacteriana para a clindamicina: 1) a inativação da droga, 2) diminuição da absorção da droga que pode ser auxiliado por um sistema de refluxo que certas bactérias apresentam, onde estas devolvem o antibiótico para fora da célula diminuindo a concentração intracelular da droga e impedindo seu efeito, e 3) a alteração genética no sítio da ligação da subunidade 50S dos ribossomos, fazendo com que a clindamicina não se ligue a eles não inibindo assim, a síntese protéica bacteriana.

KURIYAMA *et al.* (2000) observaram que a clindamicina é um potente agente contra microrganismos anaeróbios estritos, particularmente *Prevotella* pigmentadas e não pigmentadas. Recomendam o uso no tratamento de infecções orofaciais severas ou em casos nos quais a terapia com penicilina tenha falhado.

#### **f) Metronidazol**

O metronidazol é um composto derivado do grupo nitroimidazólicos. Foi introduzido em 1959, indicado exclusivamente no tratamento das vaginites provocadas por *Trichomonas vaginalis* e, alguns anos depois, como terapia de outras infecções parasitárias como amebíase e giardíase (ANDRADE,2000).

A atividade do metronidazol contra bactérias anaeróbias era totalmente desconhecida até que SHINN (1962) relatou o caso de uma paciente que fazendo uso deste medicamento no tratamento de tricomoníase vaginal acusou o alívio dos sintomas de uma gengivite ulcerativa necrosante, da qual também era portadora. Em 1964, DAVIES *et al.*, demonstraram que o metronidazol possuía ação contra os espiroquetas envolvidas na doença periodontal. Seguiram-se vários experimentos mostrando o efeito desta droga sobre os microrganismos anaeróbios, especialmente os Gram-negativos (MOENNING *et al.*, 1989).

O metronidazol é metabolizado no fígado e excretado por via renal. Seu mecanismo de ação é agir sobre o grupamento nitro, que por sua vez interrompe a síntese bacteriana (NISENGARD & NEWMAN, 1994; ANDRADE, 2000) .

Tem ação bactericida sendo muito efetivo contra anaeróbios orais, mas pouca ou nenhuma atividade contra aeróbios Gram-positivos orais incluindo *Streptococcus*. Pode ser usado em combinação com a penicilina V, amoxicilina e ainda com macrolídeos (GILL & SCULLY, 1988; MOENNING *et al.*, 1989; BAKER & FOTOS, 1994; ANDRADE, 2000). Apresenta uma concentração sangüínea de 12 µg/mL para a dose de 500mg de 8 em 8 horas.

BAKER *et al.* (1985) isolaram 139 amostras bacterianas anaeróbias da cavidade oral humana e observaram que o metronidazol foi ativo contra *A. actinomycetemcomitans*, todos os 5 grupos de *Bacteroides* testados e espécies de *Capnocytophaga*.

Os efeitos colaterais dessa droga, de acordo com os regimes empregados na odontologia, são raros incluindo a sensação de gosto metálico, boca seca, língua enrugada, anorexia e distúrbios gastrintestinais, como náusea e eventualmente vômitos, que podem ser minimizados se a medicação for administrada com alimentos (SLOTS & RAMS, 1990; GREENSTEIN, 1993).

BRAZIER *et al.* (1992) e PALMER *et al.* (1994) observaram que a incompleta anaerobiose nos testes de suscetibilidade com o metronidazol pode levar a um resultado falso resistente para microrganismos anaeróbios. Enquanto que, POULET *et al.* (1999a) avaliaram a suscetibilidade de microrganismos anaeróbios contra metronidazol e observaram a excelente atividade desta droga contra *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *Fusobacterium* spp.. Também POULET *et al.* (1999b) determinaram a suscetibilidade antimicrobiana de 13 espécies de *Prevotella intermedia* ao metronidazol através do *E-test*. Apesar do pequeno número de espécies avaliadas, foi demonstrada uma ótima atividade do metronidazol contra *P. intermedia*, sendo que as espécies foram 100% suscetíveis a este medicamento.

No estudo de ROCHE & YOSHIMORI (1997) investigando 20 abscessos periapicais, encontraram 148 microrganismos que foram testados contra metronidazol sozinho ou combinado com espiramicina. Observaram que o metronidazol mostrou boa atividade antimicrobiana contra espécies de *Prevotella*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides* e *Porphyromonas*. Todos os aeróbios estudados foram resistentes ao metronidazol.

ROTIMI *et al.* (1999) através do relato de 3 casos clínicos observaram uma alta resistência de espécies de *Bacteroides* em relação ao metronidazol, embora estes casos sejam de clínica médica e não odontológica. No entanto, avaliando a suscetibilidade de bactérias anaeróbias Gram-negativas isoladas de infecções odontogênicas KURIYAMA *et al.* (2001), observaram que a clindamicina e o metronidazol foram potencialmente ativos contra as bactérias testadas entre elas *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp. e *Fusobacterium* spp. Os autores recomendam na odontologia o uso da clindamicina e do metronidazol para pacientes onde o regime de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tenha falhado.

### 2.2.2. A escolha do agente antimicrobiano

Sabe-se que os antibióticos não promovem o reparo do processo infeccioso, mas permitem controlar a infecção até que os mecanismos de defesa do hospedeiro, inicialmente surpreendidos pelos microrganismos, consigam eventualmente debelar a infecção. Contudo, existem indicações para o uso dos antibióticos, como em casos de abscessos periapicais agudos com envolvimento sistêmico, disseminação do abscesso com ocorrência de tumefação difusa, sintomatologia e/ou exsudação persistente, abscessos periapicais agudos em pacientes de risco e como uso profilático à endocardite bacteriana (ABBOTT *et al.*, 1990; GRAD, 1997).

Quanto às infecções crônicas, geralmente não requerem antibioticoterapia, exceto durante uma exacerbação aguda bacteriana (ABBOTT *et al.*, 1990). Segundo os mesmos autores lesões periapicais crônicas estão associadas a dentes com polpas necróticas ou despulpados, ou seja, aqueles que não apresentam suprimento sanguíneo. Afirmam que a concentração de antibiótico que alcança o local de infecção - o canal radicular - é insuficiente para inibir o crescimento bacteriano, quando a administração é por via sistêmica. Contudo, em pacientes com risco de desenvolvimento de endocardite bacteriana, os antibióticos se tornam um importante agente profilático para a realização do tratamento endodôntico (ABBOTT *et al.*, 1990; GRAD, 1997).

As infecções odontogênicas são usualmente autolimitantes, porém complicações sérias podem ocorrer (HEIMDAHL & NORD, 1985). O sucesso da cura da infecção depende predominantemente da integridade dos mecanismos de defesa do hospedeiro e, se for necessário, da drenagem e debridamento dos tecidos infectados. A fonte de infecção deve ser removida ou outras terapias poderão falhar.

A eficácia de um tratamento com quaisquer antimicrobianos depende da correta identificação do(s) microrganismo(s) infectante(s) e da escolha da droga mais eficaz. Porém, somente com o uso dos antimicrobianos não se consegue erradicar uma infecção,

mas pode-se obter a redução do número de microrganismos viáveis, quer inibindo a proliferação microbiana (efeito bacteriostático), quer provocando a morte dos mesmos (efeito bactericida) (MONTGOMERY, 1991).

Deve-se levar em conta a razão risco-benefício da terapia antibiótica (toxicidade X eficácia) considerando-a individualmente para cada paciente. O uso indevido de antimicrobianos para infecções menores e doenças não-bacterianas, submete o paciente à toxicidade da droga e possibilidade de superinfecção, constituindo um risco para saúde, devido à alteração do ecossistema, favorecendo a seleção de bactérias resistentes aos agentes antimicrobianos (GROPPO, 1996).

Um dos fatores a ser considerado para a escolha de um antimicrobiano é a capacidade de ação da droga. Agentes bactericidas normalmente não necessitam de manutenção constante nos níveis sangüíneos, sendo que a concentração bactericida mínima causa lise em bactérias sensíveis. Por isso, a dose adequada pode ser dividida em intervalos regulares durante o dia (KARLOWSKY *et al.*, 1993). Os agentes bacteriostáticos, de uma forma geral, levam mais tempo para serem eficazes e dependem da manutenção constante nos níveis sangüíneos, acima das concentrações inibitórias mínimas. A dose apropriada deve ser dividida em doses regulares durante as 24 horas do dia e, caso a administração seja interrompida, a concentração sangüínea decrescerá possibilitando a sobrevivência e multiplicação dos microrganismos, causando a recorrência da infecção e o aparecimento de espécies resistentes à droga. Isto ocorre, principalmente, quando a duração do tratamento é inadequada ou quando são obtidas concentrações sub-inibitórias (LEWIS *et al.*, 1986b; KARLOWSKY *et al.*, 1993).

Acredita-se que aumentando as concentrações de um antimicrobiano acima da concentração inibitória mínima (CIM), o resultado será um aumento concomitante da taxa bactericida. Porém, vários autores têm demonstrado que a taxa de mortalidade bacteriana frente a antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos é saturável com respeito à concentração; a taxa de mortalidade máxima, *in vitro*, é tida como sendo 4 a 8 vezes àquela da concentração

bactericida mínima (CBM) (GARRET, 1978; VOGELMAIN & CRAIG, 1986; BRICELAND *et al.*, 1987; NAVASHIN *et al.*, 1989). Altas concentrações da droga não aumentam a taxa de mortalidade e podem ser prejudiciais (GROPPO, 1996).

Para a escolha de um agente antimicrobiano um outro fator é seu espectro de ação. De um modo geral podem ser divididos em antimicrobianos de pequeno espectro (eficazes contra Gram-positivos ou negativos, mas não genericamente contra ambos) e amplo espectro (eficazes contra Gram-positivos ou negativos e também contra outros microrganismos) (MONTGOMERY, 1991).

Como a identidade do(s) microrganismo(s) patógenos não é imediatamente conhecida, as drogas com amplo espectro parecem apresentar uma vantagem no tratamento economizando um tempo valioso. A desvantagem é que uma grande parte da microbiota normal do hospedeiro é destruída pela ação da droga de amplo espectro. A microbiota normal compete por este tipo de droga e reprime o crescimento de patógenos ou de outros microrganismos. Se determinados organismos da microbiota normal não são destruídos pelo antibiótico, mas seus competidores o são, os sobreviventes podem aumentar suas populações e tornarem-se patógenos oportunistas, como exemplo as superinfecções por *Candida albicans*, o qual não é sensível aos antibióticos bacterianos (TORTORA *et al.*, 2000).

A escolha adequada e criteriosa dos agentes antimicrobianos é um procedimento que requer discernimento clínico e conhecimento detalhado dos fatores farmacológicos e microbiológicos. Hoje em dia a decisão sobre o uso do antibiótico a ser indicado é ainda de forma empírica, muitas vezes sem considerar o possível microrganismo infectante. Os antibióticos são utilizados de duas formas gerais – como terapia empírica ou como terapia definitiva. Quando utilizado como terapia empírica, o antimicrobiano, deve oferecer “cobertura” contra todos os patógenos prováveis, visto que os microrganismos infectantes ainda não foram definidos. Com frequência utiliza-se a terapia de combinação ou a monoterapia com agente de amplo espectro. Todavia, uma vez identificado o

microrganismo infectante, deve-se instituir a terapia antimicrobiana definitiva – com esquema de baixa toxicidade e espectro estreito para completar o tratamento. Quando um agente antimicrobiano está indicado, o objetivo é escolher um fármaco seletivamente ativo contra os microrganismos infectantes mais prováveis, que tenha menor potencial de produzir toxicidade ou reações alérgicas no indivíduo que está sendo tratado (CHAMBERS & SANDE, 1996).

Portanto, a escolha do antibiótico a ser prescrito deve ser baseada em fatores como dados laboratoriais, saúde do paciente, idade, sintomas de alergia, absorção, capacidade de distribuição da droga e nível do plasma sanguíneo e de preferência sem provocar efeitos tóxicos no paciente. Dados em relação a 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 através dos testes de suscetibilidade antimicrobiana, permitindo o desenvolvimento de métodos de ação para um tratamento mais eficaz (ROSENBLATT & BROOK, 1993).

### ***2.2.3. Testes de suscetibilidade antimicrobiana***

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana são usados para determinar a concentração de um antibiótico necessária para inibir o crescimento do microrganismo *in vitro*. A menor concentração da droga capaz de inibir o microrganismo é denominada de concentração inibitória mínima (CIM) (WALKER, 1992), geralmente quantificada em mg/mL, sendo estes resultados quantitativos. De acordo com os critérios estabelecidos pelo

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

A função mais importante dos testes de suscetibilidade é a de permitir detectar resistência antimicrobiana de relevância clínica por parte de microrganismos causadores de processos infecciosos (AMATO-NETO *et al.*, 2000). Com o aparecimento de bactérias resistentes aos antibióticos, o interesse em testes de suscetibilidade antimicrobiana aumentou.

Segundo TOMASZ (1994) a medicação antibiótica empírica é a grande causa da resistência bacteriana. Portanto, o uso indiscriminado da antibioticoterapia pelos cirurgiões-dentistas, deve ser desencorajado.

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

HARRISON (1999) alerta para o problema do surgimento de infecções resistentes aos antibióticos atualmente disponíveis. Assim muitas bactérias, clinicamente importantes, são capazes de mostrar-se resistentes a certos agentes antimicrobianos freqüentemente utilizados na presença de infecções. Portanto, torna-se necessário, em

determinadas situações, a realização de testes laboratoriais para detectar a suscetibilidade antimicrobiana ou resistência desses microrganismos (FINEGOLD *et al.*, 1988; CULLMAN *et al.*, 1993; ROSEMBLATT & BROOK, 1993; VAN STEENBERG *et al.*, 1993).

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana, além de serem realizados através da obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), também são obtidos por meio da concentração bactericida mínima (CBM) de um antibiótico, que é aquela necessária para obter a morte da célula bacteriana. Os microrganismos são colocados em um mesmo meio *in vitro*, para verificar a viabilidade da bactéria, na presença de um medicamento específico em uma determinada concentração (FORBES *et al.*, 1998). Trata-se de uma prova importante principalmente em algumas situações clínicas, pois fornece subsídios para a verificação da dose terapêutica adequada.

Os métodos utilizados são: testes de suscetibilidade convencionais como diluição em caldo (BARNARD *et al.*, 1996), diluição em ágar (BAKER *et al.*, 1985; YAMAMOTO *et al.*, 1989; ABU-FANAS *et al.*, 1991), método de difusão com discos em ágar (ZELDOW *et al.*, 1962), testes de suscetibilidade comerciais, que são variações dos métodos convencionais de diluição (CULLMAN *et al.*, 1993) e difusão (CITRON *et al.*, 1991; NGUI-YEN *et al.*, 1992; OLSSON-LIJEQUEST, 1992; BROWN, 1992; BOLMSTRÖM, 1993; CONTI *et al.*, 1999; LE GOFF *et al.*, 1997; VIGIL *et al.*, 1997).

A *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) indica a utilização dos testes de suscetibilidade antimicrobiana nas seguintes situações: determinação do padrão de suscetibilidade dos microrganismos a novos agentes antimicrobianos; monitoramento periódico dos padrões de suscetibilidade de bactérias dentro de uma área geográfica ou centro de saúde; auxílio ao tratamento de pacientes em casos de fracassos de terapêutica ou infecções persistentes, em casos da presença de uma espécie resistente aos agentes antimicrobianos comumente utilizados, na ausência de

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

Contudo, os testes de suscetibilidade antimicrobiana apresentam limitações, pois a CIM no plasma, não reflete a concentração do antibiótico no sítio de infecção (CHAMBERS & SANDE, 1996).

#### **2.2.4. Métodos para avaliação dos testes de suscetibilidade antimicrobiana**

Diversos métodos existem, desde os convencionais até os mais modernos, para a realização dos testes de suscetibilidade *in vitro*.

O método da difusão do disco possibilita a avaliação qualitativa da sensibilidade aos antimicrobianos, permitindo a classificação dos microrganismos testados em sensíveis, intermediários ou resistentes, e foi descrito primeiramente por BAUER *et al.*, 1966. Consiste em discos comerciais de papel de filtro impregnados com quantidades específicas dos diversos antimicrobianos que são aplicados sobre a superfície de uma placa de ágar previamente semeada com o inóculo padronizado do microrganismo a ser testado. O antimicrobiano contido nos discos difunde-se no meio de cultura, de modo que sua concentração diminui na medida em que se distancia do disco, formando-se, assim, uma espécie de gradiente de concentração do antimicrobiano ao redor de cada disco. Simultaneamente com a difusão do medicamento, o microrganismo inoculado na superfície desse meio de cultura, cujo crescimento não é inibido, continua a multiplicar-se, de modo que seu crescimento se torna visível. Nas áreas onde a concentração do antimicrobiano é inibitória, não ocorre crescimento do microrganismo, formando-se então, zona de inibição ao redor dos discos (AMATO-NETO *et al.*, 2000). Este método não apresenta a capacidade de determinar a CIM, impossibilitando conhecimentos mais precisos quanto ao grau de resistência ou suscetibilidade do microrganismo, sendo uma de suas principais desvantagens. Também não é um método aceitável para o teste de microrganismos de

crescimento lento (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993).

Quanto aos métodos de diluição, estes são empregados para determinar a menor concentração do antimicrobiano necessária para inibir o crescimento de determinado microrganismo ou destruí-lo CIM e CBM, (respectivamente). Os testes de diluição podem ser realizados tanto em meio sólido como em meio líquido. Os antimicrobianos são testados em diluições seriadas e a menor concentração que inibe o crescimento visível do microrganismo testado é relatada como sendo a CIM (AMATO-NETO *et al.*, 2000).

O método de diluição em meio líquido também conhecido como microdiluição ou macrodiluição, consiste em colocar o microrganismo e o antimicrobiano em meio líquido. Cada agente antimicrobiano é testado usando uma série de concentrações µg da droga/ mL do caldo determinando a CIM. O exame de crescimento é determinado por meio da análise de turbidez do meio de cultura (FORBES *et al.*, 1998). Investigadores como FINEGOLD *et al.* (1988), ROSENBLATT & BROOK (1993), WEXLER (1993), FORBES *et al.* (1998) afirmam que uma das limitações deste método é a incapacidade de fornecer resultados acurados para microrganismos de crescimento lento, pois períodos de incubação prolongados acima de 24 horas, podem levar a deteriorização do antimicrobiano e resultar em um falso resultado de resistência.

Já o teste de diluição em meio sólido baseia-se no preparo de placas contendo meios à base de ágar com diferentes concentrações de um determinado antimicrobiano, onde posteriormente serão inoculados os microrganismos. Após a incubação as placas são examinadas quanto ao crescimento do microrganismo obtendo a CIM do antimicrobiano (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993; FORBES *et al.*, 1998).

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

Consiste de metodologia de simples execução que não necessita de equipamento especial, sendo de grande valia em laboratórios que não dispõem de sistemas automatizados, assim como para as situações em que se requer avaliação mais precisa da resistência a determinados antimicrobianos.

O *E-test* é um método simples de realizar e fácil de interpretar, utilizado para testes de suscetibilidade antimicrobiana (CITRON *et al.*, 1991; NGUI-YEN *et al.*, 1992; OLSSON-LIJEQUEST, 1992; BROWN, 1992; BOLMSTRÖM, 1993; VIGIL *et al.*, 1997). É um teste de suscetibilidade comercial e representa uma variação do método de difusão em ágar. Foi desenvolvido combinando, a conveniência e praticidade do método com disco, com a capacidade de determinar a concentração inibitória mínima (CIM) (BOLMSTRÖM, 1993). Este sistema compreende um gradiente exponencial pré-determinado do quimioterápico a ser testado, para definir a concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL de antibióticos individuais contra bactérias (VIGIL, *et al.* 1997; CONTI *et al.*, 1999). Constitui-se de uma fita plástica de 50 mm de comprimento e 5 mm de largura, contendo em um lado um gradiente de concentração de antibiótico, e do outro, uma escala numérica que indica a concentração do medicamento, propiciando a difusão de um gradiente de antibiótico. É interpretado através da formação de uma zona elíptica de inibição, sendo que o ponto de intersecção da borda da zona de inibição com a escala numérica na fita, referente à concentração da droga, representa a concentração inibitória mínima. A fita de *E-test* detecta uma CIM que pode variar de 0,016 a 256 µg/mL, somando o total de 29 diferentes concentrações, que são agrupadas de duas em duas, representando 15 níveis de diluição (BOLMSTRÖM, 1993). As fitas de *E-test* devem ser armazenadas a -20°C com sílica gel, que deve estar com a coloração azul, sendo colocadas individualmente em tubos.

Em 1992, BROWN comparou os resultados das CIMs obtidas através do método do *E-test* e da diluição em ágar, utilizando várias espécies bacterianas isoladas

cl clinicamente, em sua maioria anaeróbias facultativas. Apresentou uma concordância de 87,9% ( $\pm 1$  grau de diluição). Concluiu que o método do *E-test* apresentou boa correlação com o método de diluição em ágar para a determinação das CIMs. Relatou que o método do *E-test* apresenta versatilidade e facilidade de uso, características desejáveis para a rotina de um laboratório de microbiologia clínica.

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

NGUI-YEN *et al.* (1992) avaliaram a exatidão e a reprodutibilidade do *E-test*, comparando-o ao método da microdiluição. Utilizaram 208 espécies bacterianas, incluindo os gêneros *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Staphylococcus*, obtiveram resultados semelhantes para os dois métodos comparados. Relataram que o *E-test* mostrou ser um método confiável quanto à capacidade de reproduzir os resultados, quando se repetiu o teste por cinco dias sobre um grupo selecionado de bactérias, e os mesmos resultados foram obtidos, dentro de um intervalo de  $\pm 1$  diluição. Concluíram que o *E-test* consiste em um método simples, seguro e capaz de ser reproduzido para a determinação da CIM de organismos Gram-positivos.

O método do *E-test* também tem indicações para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas (CITRON *et al.*, 1991; NACHNANI *et al.*, 1992; BOLMSTRÖM, 1993; CONTI *et al.*, 1999). Devido ao crescimento lento de algumas bactérias anaeróbias estritas, os testes de suscetibilidade passam a ser mais desafiantes,

quando comparados com bactérias aeróbias e anaeróbias facultativas (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993).

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

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

Para testar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias estritas, a NCCLS preconiza os seguintes métodos padronizados: diluição em ágar e microdiluição em caldo (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; WEXLER, 1993). Entretanto, o método do *E-test* tem sido avaliado e tem apresentado resultados positivos, quando comparados com métodos padronizados da diluição em ágar (CITRON *et al.*, 1991; NACHANI *et al.*, 1992; BOLMSTRÖM, 1993; CONTI *et al.*, 1999). Contudo, LE GOFF *et al.* (1997) com objetivo de verificar a suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de polpas necróticas, utilizaram o *E-test* e observaram que no total de 66 bactérias anaeróbias estritas testadas, apenas 38 apresentaram resultados confiáveis após a leitura no tempo máximo citado pelos fabricantes (AB BIODISK, 2000) de 48 horas. Realizaram a leitura dos testes após 24 e 48 horas de incubação, sendo a segunda leitura idêntica à diluição mais próxima. Os autores afirmam que, embora os resultados encontrados fossem

satisfatórios, a razão entre o número de espécies testadas e de resultados obtidos era insuficiente, confirmando que nenhum método é universalmente aplicável para as bactérias anaeróbias estritas. Explicaram ainda, que algumas bactérias necessitam de um período de incubação superior a 48 horas, tempo durante o qual as moléculas de antibióticos poderiam sofrer degradação, levando a mensuração incorreta do gradiente de concentração.

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

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

NACHNANI *et al.* (1992) avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana de 60 espécies 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. Para os anaeróbios estritos foram encontrados 100% de sensibilidade aos antibióticos. Para os microrganismos facultativos, a sensibilidade variou de 97% a 100%, exceto contra o metronidazol, que teve 75% de sensibilidade.

WUST & HARDEGGER (1992) avaliaram a suscetibilidade de 146 isolados clínicos anaeróbios Gram-negativos e Gram-positivos. Utilizaram os métodos *E-test* e diluição em ágar com os meios de cultura Wilkins-Chalgren e Brucella Agar suplementados com sangue desfibrinado de carneiro adicionado de vitamina k e hemina realizando a leitura com 20 e 44 horas de incubação. Observaram que a leitura dos resultados foi considerada mais confiável após 44 horas de incubação. Recomendam o uso dos dois meios de cultura testados no estudo para o desenvolvimento do método do *E-test*. Não foram encontradas grandes discrepâncias entre os dois métodos.

COUROUX *et al.* (1993) compararam o *E-test* e o método de diluição em ágar testando 92 espécies 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%).

APPELBAUM *et al.* (1994) compararam o *E-test* com o método de diluição em ágar quanto à suscetibilidade de 209 bastonetes Gram-negativos (117 espécies do grupo *Bacteroides fragilis*, 24 *Fusobacterium* spp. e 68 outras espécies (principalmente espécies de *Prevotella*)) contra diversos antibióticos dentre eles ampicilina, amoxicilina combinado com ácido clavulânico e clindamicina. Os métodos mostraram-se com resultados similares sendo o *E-test* um método preciso e prático para os microrganismos testados.

SCHIEVEN *et al.* (1995) investigando 92 espécies de anaeróbios Gram-negativos e 58 de anaeróbios Gram-positivos compararam os métodos do *E-test* e de

diluição em ágar. Observaram que houve concordância entre os resultados dos dois métodos, sendo que, em geral, foi maior para os anaeróbios Gram-positivos que para os Gram-negativos. Afirmaram que com o *E-test*, os testes de suscetibilidade de organismos individuais ou antibióticos podem ser desenvolvidos sem desperdício.

ROSENBLATT & GUSTAFSON (1995) compararam os resultados do teste de suscetibilidade de 220 bactérias anaeróbias estritas contra 14 agentes antimicrobianos usando o método do *E-test* e diluição em ágar. Os resultados do *E-test*, mostraram-se após 24 horas, legíveis ou interpretáveis para somente 64% dos anaeróbios isolados testados. Contudo após 48 horas, os resultados foram legíveis para 95% do total de isolados. Assim, após 48 horas, os autores afirmam que houve uma similaridade nos resultados dos dois métodos.

SPANGLER *et al.* (1995) avaliaram a suscetibilidade de 201 anaeróbios estritos contra eritromicina, azitromicina, claritromicina e roxitromicina, através dos métodos do *E-test* junto com o método *Oxrase* e o método da diluição em ágar. Claritromicina foi levemente mais efetiva que os outros antimicrobianos e houve similaridade dos resultados entre os dois métodos.

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

amoxicilina + ácido clavulânico. As espécies de *Fusobacterium* foram sensíveis aos agentes  $\beta$ -lactâmicos e a clindamicina, mas três foram resistentes a eritromicina.

CONTI *et al.* (1999) testou a suscetibilidade antimicrobiana de 20 espécies de *Prevotella intermedia/nigrescens* e 19 de *Porphyromonas gingivalis* isoladas da bolsa periodontal. O método utilizado foi o *E-test* obtendo as CIMs após 48 horas. Concluiu que o método é reproduzível, prático e sensível para determinar o padrão de suscetibilidade das espécies bacterianas anaeróbias estritas testadas.

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

POULET *et al.* (1999b) avaliando a suscetibilidade da *P. intermedia* contra o metronidazol observaram que o *E-test* é um método simples, rápido e confiável para determinar a CIM do metronidazol para a *P. intermedia*. Porém, é um método relativamente de alto custo o que o impediria de ser utilizado como método de rotina.

SOUSA (2000) coletou amostras de 30 canais radiculares associados a abscessos periapicais e avaliou a suscetibilidade antimicrobiana de 2 espécies mais prevalentes nestes canais utilizando o *E-test*. Os antibióticos testados foram: benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato de potássio, metronidazol e clindamicina. *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* apresentaram-se sensíveis a todos os antibióticos testados.

## b) Teste de $\beta$ -lactamase

As  $\beta$ -lactamases podem ser definidas como enzimas modificadoras de antibióticos. Basicamente são enzimas bacterianas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico ou se ligam ao anel das penicilinas e cefalosporinas inativando o antibiótico, uma vez que o ácido penicilínico (subproduto da degradação) não tem qualquer atividade antimicrobiana. (FIG. 1).

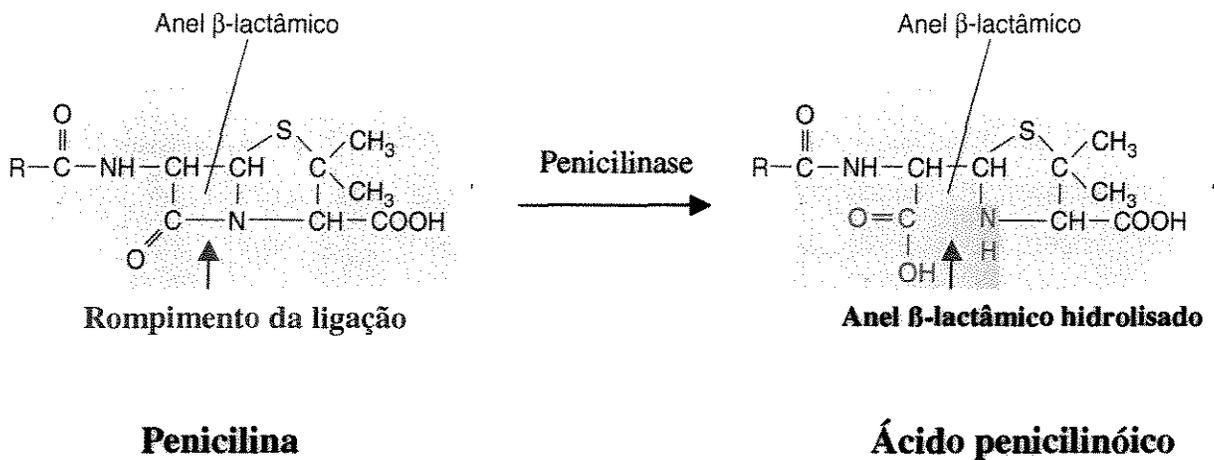


FIGURA 1- Enzima  $\beta$ -lactamase hidrolisando o anel  $\beta$ -lactâmico. R é uma abreviação para os grupos químicos laterais que diferenciam componentes similares ou idênticos.

FONTE: TORTORA *et al.*, 2000.

Pertencem a uma família de enzimas que são o mecanismo quase que exclusivo de resistência dos estafilococos às penicilinas em um extremo, até serem componentes clinicamente insignificantes da parede celular de algumas bactérias entéricas. Qualquer antibiótico ou grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos pode ser inativado por essas enzimas. Atualmente, o número destas enzimas é superior a 170 e o ritmo de crescimento deste

número não mostra sinais de redução (MEDEIROS, 1997). Assim a especificidade da  $\beta$ -lactamase para um antibiótico é um importante determinante da eficácia com a qual a enzima hidrolisa o antibiótico. Quando uma mutação pontual em um ou mais aminoácidos ocorre em uma área estruturalmente crítica da enzima, a especificidade da molécula pode ficar alterada (BUSH, *et al.*, 1995). Grupos de pesquisadores apóiam-se no conceito de que a função fisiológica das  $\beta$ -lactamases é reestruturar o glicopeptídeo durante o crescimento da célula bacteriana (TUOMANEN *et al.*, 1991). Esses pesquisadores verificaram que a síntese de  $\beta$ -lactamase é induzida tanto pela presença de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos quanto pela de precursores da parede celular no meio extracelular.

As  $\beta$ -lactamases podem ser classificadas de acordo com sua estrutura molecular. Assim, aquelas que pertencem à classe A, que é o grupo mais importante, são enzimas que têm afinidade pelas penicilinas, encontradas nos cromossomos ou em plasmídeos bacterianos. As da classe B são metaloenzimas que apresentam menor importância clínica. Classe C são, sobretudo, cefalosporinases encontradas nos cromossomos de bactérias Gram-negativas e a Classe D são as oxacilinasas que apresentam pouca importância clínica (KONEMAN *et al.*, 2001). Resumidamente, pode-se dizer que são encontradas em uma ampla variedade de espécies bacterianas.

O ponto final do problema das proteínas reconhecedoras de penicilina foi o aparecimento de inibidores das  $\beta$ -lactamases (BUSH, 1988; LIVERMORE, 1993). Esses compostos são suficientemente similares aos antibióticos para se fixarem às  $\beta$ -lactamases, de forma reversível ou irreversível, protegendo os antibióticos da hidrólise (LIVERMORE, 1993). Os inibidores de  $\beta$ -lactamases encontrados são o clavulanato de potássio, o sulbactam e o tazobactam. Os três são eficazes contra a penicilinase estafilocócica e têm eficácia variável contra enzimas cromossômicas das bactérias Gram-negativas (KONEMAN *et al.*, 2001).

A presença de  $\beta$ -lactamase, que pode ser rapidamente detectada, é um indicio precoce de que um isolado não responderá aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em questão (KONEMAN *et al.*, 2001).

O método mais sensível para detecção desta enzima é testar o microrganismo com uma cefalosporina cromogênica, a qual se torna vermelha quando o anel  $\beta$ -lactâmico é hidrolisado. Esta cefalosporina é comercialmente chamada de nitrocefim, que é um indicador rápido dos sistemas inativadores de  $\beta$ -lactâmicos. O nitrocefim, no entanto, nunca deve substituir por completo as técnicas convencionais de testes de suscetibilidade antimicrobiana, uma vez que existem outros fatores que também influenciam os resultados de tais testes e, em alguns casos, não há correlação entre a resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos e a produção de  $\beta$ -lactamase (WEXLER, 1991; KATSANIS *et al.*, 1994; KONEMAN *et al.*, 2001).

O teste de  $\beta$ -lactamase é simples e rápido, podendo ser usado como um suplemento a testes de suscetibilidade convencionais. Se uma espécie é  $\beta$ -lactamase positiva, esta provavelmente seria resistente a agentes antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (ex. penicilinas e as primeiras gerações de cefalosporinas) e também podendo ser suscetível a agentes antimicrobianos quando combinados com um inibidor de  $\beta$ -lactamase tais como clavulanato de potássio ou mesmo gerações avançadas de cefalosporinas. Porém, não se pode afirmar que uma espécie seria suscetível a agentes antimicrobianos simplesmente por que esta não produz  $\beta$ -lactamase (WEXLER, 1991). Do mesmo modo, este autor afirma que *B. gracilis*, *Bilophila wadsworthia* e muitas espécies de *B. distasonis* não produzem  $\beta$ -lactamase e são totalmente resistentes a agentes  $\beta$ -lactâmicos.

APPELBAUM *et al.* (1990a) encontraram cerca de 50% de espécies de *Prevotella intermedia* resistentes à penicilina, em 27 espécies investigadas. Cerca de 60% das espécies 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 estes resultados enfatizam a significativa taxa da produção  $\beta$ -lactamase em espécies de *Bacteroides* e fusobacteria e indicam a necessidade de testes de  $\beta$ -lactamase para estes isolados.

APPELBAUM *et al.* (1990b) investigaram 978 espécies de *Bacteroides* e *Fusobacterium* quanto à produção de  $\beta$ -lactamase através do teste de disco (cefina) e teste do nitrocefina. Em 83% das espécies ambos os testes foram positivos e em 14,8% ambos foram negativos. Em 1,7% das espécies o teste do disco foi positivo e o nitrocefina negativo, e em 0,4% do teste do disco foi negativo, porém positivo para o nitrocefina. O teste do disco foi menos discriminatório na detecção de espécies resistentes a amoxicilina. O teste do nitrocefina foi menos sensível que o teste do disco, porém mais discriminatório quando os resultados foram interpretados dentro de 1 e 2 horas para *Bacteroides* spp. e fusobacteria respectivamente. Incubação além deste tempo pode levar a resultados falso-positivo. Os autores concluíram que a utilidade clínica dos testes para a atividade de  $\beta$ -lactamase para anaeróbios ainda não está claramente estabelecida.

KONONEN *et al.* (1997) examinaram a frequência de produção de  $\beta$ -lactamase por espécies de *Prevotella* pigmentadas, isoladas da cavidade oral de 23 crianças com menos de 1 ano de idade, utilizando o nitrocefina, e determinaram as concentrações inibitórias mínimas das espécies  $\beta$ -lactamase positivas usando *E-test* e o método de diluição em ágar. Foram encontradas 186 espécies de *Prevotella*  $\beta$ -lactamase positivas, e as concentrações inibitórias mínimas de benzilpenicilina dessas espécies variaram entre 0,38 e 64  $\mu\text{g/mL}$ . Os autores concluíram que a produção de  $\beta$ -lactamase por espécies de *Prevotella* pigmentadas está sendo frequente em crianças menores de 1 ano de idade.

BERNAL *et al.* (1998) investigaram a produção de  $\beta$ -lactamase com nitrocefina, e a suscetibilidade antimicrobiana através do *E-test*. Noventa e seis espécies de *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* isoladas de diferentes locais da cavidade oral, de coletas vindas de diferentes áreas geográficas foram avaliadas. Setenta e uma espécies (74%)

foram sensíveis a amoxicilina e a amoxicilina combinada com ácido clavulânico, 25 mostraram-se produtoras de  $\beta$ -lactamase, a maioria destas *P. nigrescens*. Os resultados observados por estes autores fornecem suporte ao importante papel da *P. nigrescens* no insucesso da terapia com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

HANDAL & OLSEN (2000) apresentaram uma visão geral sobre os mecanismos de resistência à penicilina, principalmente quanto à produção de  $\beta$ -lactamase. Concluíram que bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase são comuns na cavidade oral e que, em geral, mais microrganismos produtores de  $\beta$ -lactamase podem ser isoladas de pacientes que tenham sido recentemente tratados com antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. No entanto, bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase geralmente constituem apenas uma pequena parcela da microbiota cultivável total. Cada vez que o antibiótico é administrado, a fração individual de bactérias resistentes aumenta. Após algumas semanas do fim da antibioticoterapia, a microbiota normal se restabelece. Isto se deve a uma redução do número de espécies resistentes, uma vez que elas têm que utilizar a energia, que seria usada na reprodução, para manter suas características de resistência. Se a antibioticoterapia é muito prolongada, há um risco de destruir a microbiota normal e, assim, favorecer o crescimento de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamase.

KURIYAMA *et al.* (2001) avaliaram a incidência da produção de  $\beta$ -lactamase, utilizando o teste do nitrocefim, de 191 bacilos aneróbios Gram-negativos isolados de 93 amostras de exsudato purulento provenientes de infecções odontogênicas, e a suscetibilidade antimicrobiana destes isolados contra 11 antibióticos. Produção de  $\beta$ -lactamase foi detectada em 35,6% das espécies de *Prevotella* pigmentadas e em 31,9% das não pigmentadas. Em nenhuma das espécies de *Porphyromonas*, *Fusobacterium* e *Bacteroides* foi detectada a produção de  $\beta$ -lactamase. Ampicilina e cefalosporina mostraram uma atividade menos eficiente contra as espécies produtoras de  $\beta$ -lactamase, enquanto que a atividade da ampicilina combinado com sulbactam, cefametazol e imipenem continuaram a ser efetiva contra essas espécies. Todos os antibióticos  $\beta$ -

lactâmicos foram efetivos contra *Porphyromonas* spp. e *Fusobacterium* spp.. Eritromicina teve uma atividade baixa contra espécies de *Prevotella* não pigmentadas e *Fusobacterium* spp.. Clindamicina, minociclina e metronidazol foram eficazes contra as espécies testadas.

A compreensão e interpretação do papel e dos mecanismos desempenhados pelos microrganismos na etiopatogenia dos processos patológicos pulpares e periapicais no sentido de investigar a composição da microbiota de canais radiculares infectados, associados a abscessos periapicais; determinar se há correlação entre espécies bacterianas específicas e a localização clínica dos abscessos periapicais, bem como com alguns sinais e sintomas endodônticos é importante podendo, inclusive, interferir no planejamento e conduta do tratamento endodôntico. Da mesma maneira, como a necessidade de se prescrever um antibiótico é imediata, a escolha deve ser baseada no conhecimento atualizado da microbiologia endodôntica. Com o surgimento de bactérias resistentes aos antibióticos de rotina, torna-se importante o monitoramento da suscetibilidade de bactérias de canais radiculares associados com abscessos periapicais, frente a diversos antibióticos, através de teste de suscetibilidade antimicrobiana.

### 3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi:

- 3.1. Investigar a composição da microbiota de canais radiculares infectados, associados a abscessos periapicais;
- 3.2. Determinar se há correlação entre espécies bacterianas específicas e a localização clínica dos abscessos periapicais;
- 3.3. Determinar a existência de correlação entre os microrganismos encontrados e os diferentes sinais e sintomas de origem endodôntica;
- 3.4. Analisar a suscetibilidade de bactérias anaeróbias mais prevalentes de canais radiculares associados com abscessos periapicais, frente a diversos antibióticos, através do teste de sensibilidade antimicrobiana com *E-test* e  $\beta$ -lactamase.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais**

#### ***4.1.1. Seleção dos pacientes***

Participaram deste estudo 60 pacientes com necessidade de tratamento endodôntico, de dentes associados a abscessos periapicais, sem história de antibioticoterapia prévia. Os pacientes assinaram termo de consentimento (ANEXO 1) elaborado de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP (ANEXO 2). Pacientes que haviam recebido antibioticoterapia prévia de 6 meses, dentes em que não se conseguiu realizar um correto isolamento absoluto seguido de uma descontaminação adequada, casos em que não foi possível alcançar um comprimento adequado do canal radicular durante a coleta das amostras e dentes que apresentaram bolsas com comunicação endo-periodontal, não foram considerados neste trabalho. Assim, foram realizadas 60 coletas microbiológicas em condições adequadas de descontaminação e padronização. Os pacientes apresentaram idade de 11 a 63 anos com média de 30 anos, sendo 32 mulheres e 28 homens.

#### ***4.1.2. Avaliação dos pacientes***

Para cada paciente foram anotados dados pessoais, história médica significativa, história dental (condição pulpar e periapical, presença ou não da dor, profundidade de bolsas periodontais, mobilidade dental, presença ou não de cáries e restaurações), exames intra e extra-bucais (presença de fistula e sua origem, presença de edema dos tecidos periodontais, simetria facial, aparência geral), história de antibioticoterapia prévia nos 6 meses anteriores ou outras medicações, e os achados radiográficos.

#### 4.1.3. Critérios clínicos para diferenciação da localização dos abscessos periapicais

Os critérios clínicos utilizados para a diferenciação da localização dos abscessos estão descritos resumidamente na TAB. 4- a seguir:

TABELA 4  
Critérios clínicos para diferenciar os abscessos periapicais quanto a localização.

Sinais/Sintomas	Abscessos Periapicais					Extra-oral
	Intra-oral					
	P	SP	SM	FZ	F	
DOR	+	+	+	+/-	+	+
DOR PALP	+	+	+	+/-	-	+
EDEM	+/-	+*/-	+	+/-	-	+
T PERC	+	+	+	+/-	+	+
MOB	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
LES PP	-	-	+/-	+	+	+
ESPES	+	+	+/-	-	-	-
DIFUSO	-	-	+/-	-	-	+/-
LOCALIZ	+	+	+/-	+	+	+/-

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

+ = presente    - = ausente    +/- = pode ou não estar presente    +\* = leve

#### 4.1.4. Coleta das amostras

Foram coletadas amostras microbiológicas apenas de canais radiculares de dentes com diagnóstico clínico de abscesso periapical. A assepsia foi mantida durante toda a terapia endodôntica e durante coleta de amostras microbiológicas e em cada dente foi realizada a coleta de um único canal radicular. Nos dentes multirradiculares somente o canal mais amplo (molares inferiores no canal distal e molares superiores no canal palatino)

foi obtida a amostra, de maneira a confinar o exame microbiológico em um único ambiente ecológico. Polpa necrótica foi observada em 56 canais radiculares e em 4 com tratamento endodôntico prévio.

Antes da coleta de amostra do canal radicular todos os dentes foram submetidos à remoção de contaminantes coronários, isolamento absoluto do dente com a utilização do lençol de borracha e descontaminação do campo operatório usando “swabs” estéreis umedecidos com hipoclorito de sódio 5,25% e neutralização com tiosulfato de sódio 5% (MÖLLER, 1966) para se evitar a contaminação química do espaço pulpar, método de descontaminação utilizado por DOUGHERTY *et al.* (1998).

A abertura coronária foi preparada sem o uso de água “spray” sendo resfriado com solução salina estéril e utilizando broca estéril sem tocar no tecido pulpar radicular. Remoção cuidadosa do tecido pulpar necrótico coronário e subsequente, ampliação do terço coronário do canal radicular foi desenvolvido rotineiramente para evitar contaminação da ponta de papel durante a coleta, pelo conteúdo da polpa coronária. Quando o canal radicular apresentava-se atrésico, interferindo na penetração da ponta de papel absorvente, a patência deste, foi estabelecida com mínimo de instrumentação utilizando-se a lima #10, e sem o uso de qualquer irrigante.

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

Em nenhum caso a coleta microbiológica foi precedida por irrigação com qualquer agente químico. Nos casos em que os canais radiculares apresentaram-se secos,

foi realizado irrigação com solução salina estéril para propiciar um ambiente úmido, favorecendo a coleta microbiológica.

As amostras foram coletadas no início da primeira intervenção endodôntica com 3 pontas de papel absorvente estéreis (Tanari-Tariman Ltda., Manaus-AM, Brasil) introduzidas no comprimento do canal (determinado pela radiografia inicial padronizada com o uso de posicionador, da qual obteve-se o comprimento de trabalho pré-estabelecido), permanecendo nesta posição por 60 segundos (FIG. 2). Os casos em que não foram possíveis alcançar um adequado comprimento do canal radicular para a realização da coleta microbiológica, foram imediatamente excluídos.

Embora as bactérias anaeróbias estritas apresentem uma tolerância no contato com o oxigênio, realizou-se a coleta das amostras microbiológicas sob fluxo contínuo de nitrogênio (FIG. 2) para que o procedimento da coleta pudesse ser realizado o mais livre possível do O<sub>2</sub>, auxiliando na manutenção da viabilidade das bactérias anaeróbias estritas (BERG & NORD, 1973). Esse procedimento foi realizado com o auxílio de um cilindro de gás nitrogênio, ao qual se encontra acoplado uma válvula de segurança (WHITE MARTINS, mod. R 86-N, São Paulo-SP, Brasil), uma mangueira e uma cânula aspiradora endodôntica, formando um dispositivo que direciona o gás somente para a região do dente no qual foi realizada a coleta (FIG. 3).

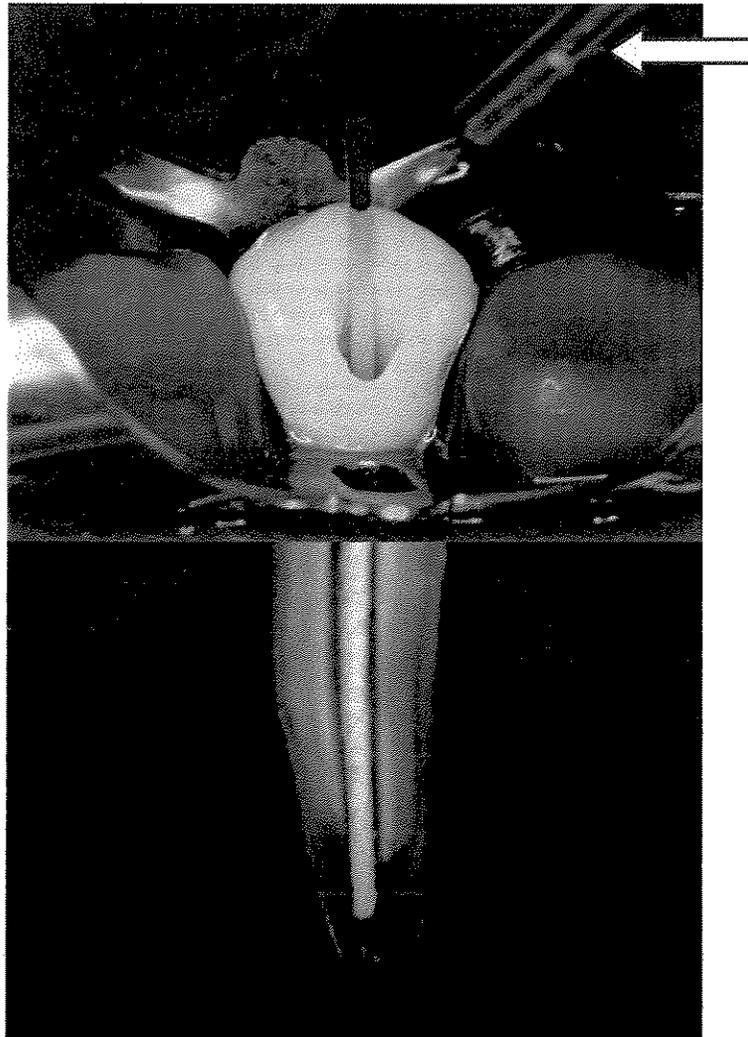


FIGURA 2- Coleta da amostra microbiológica. Ponta de papel absorvente estéril introduzida no comprimento de trabalho pré-estabelecido sob fluxo contínuo de nitrogênio (ver seta).

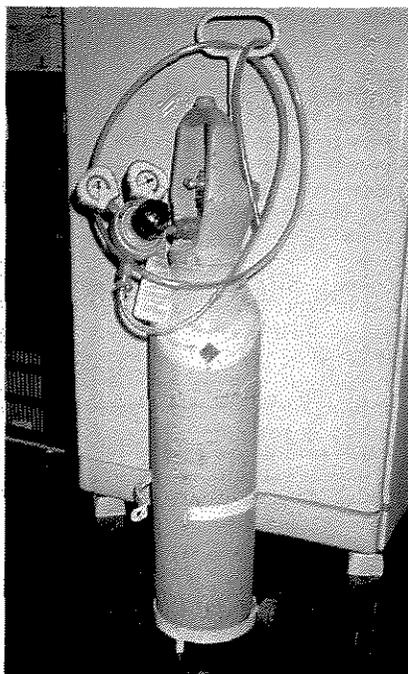


FIGURA 3- Sistema de gás utilizado durante a coleta microbiológica.

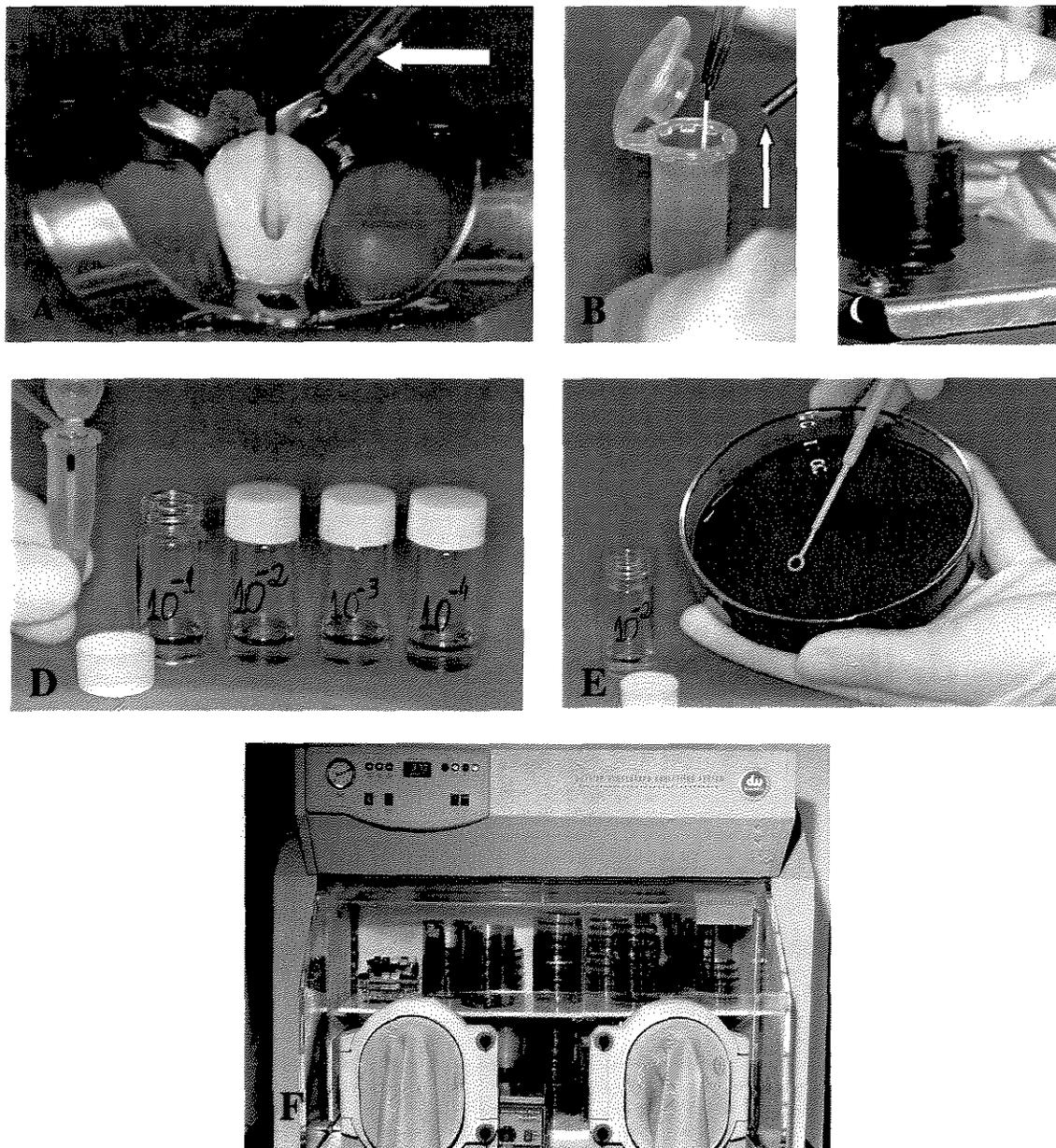
#### **4.1.5. Inoculação e Incubação**

Depois de realizada a coleta microbiológica (FIG.4A), as pontas de papel absorvente com a coleta foram imediatamente colocadas em eppendorf estéril com 1,0 mL (FIG. 4B) de meio de transporte RTF - Reduced Transport Fluid (SYED & LOESCHE,1972) - (ANEXO 3), o qual foi transportado para o laboratório de Microbiologia da área de Endodontia e colocado na câmara de anaerobiose dentro de 15 minutos. Os eppendorfs foram agitados mecanicamente (Agitador - MA 162-MARCONI, São Paulo-SP, Brasil) por 1 minuto (FIG.4C). À seguir, foram realizadas diluições seriadas a 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 (FIG. 4D) em meio para anaeróbios exigentes - Fastidious Anaerobe Broth (FAB) LAB-M, Bury - Inglaterra) (ANEXO 4) e inoculados 50 µL de cada diluição em placas pré-reduzidas (FIG.4E) contendo Fastidious Anaerobe Agar (FAA, LAB-M, Bury-Inglaterra) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro, e FAA+ 5% de sangue desfibrinado de carneiro + suplementos seletivos para anaeróbios (GN-OXOID-Hampshire-

Inglaterra) (ANEXO 4), as quais foram incubadas em cabine de anaerobiose (DON WHITLEY SCIENTIFIC, Bradford-Inglaterra) (FIG. 4F), a 37°C na atmosfera de 10% de H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub> e 80% N<sub>2</sub> e foram examinadas após 2, 5 e 14 dias, para permitir a detecção de organismos de crescimento lento. Mais 50 µL de cada diluição foram inoculadas em placas contendo Brain Heart Infusion agar (BHI) (Oxoid, Hampshire, UK) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro, as quais foram aerobicamente incubadas a 37°C, sendo examinadas após 18h e 2 dias para selecionar microrganismos aeróbios e anaeróbios facultativos.

Imediatamente após a diluição, todas as coletas microbiológicas foram congeladas a – 70°C, com o objetivo de serem utilizadas em pesquisas futuras.

Os meios de cultura foram preparados de acordo com as orientações dos fabricantes (ANEXO 3).



**FIGURA 4-** Procedimentos utilizados durante a coleta microbiológica. A.Introdução da ponta de papel absorvente no canal radicular; B. Ponta de papel absorvente com a coleta microbiológica no meio de transporte RTF sob fluxo contínuo de nitrogênio (ver seta); C. Coleta sendo agitada no agitador de tubos; D. Diluição da coleta; E. Inoculação e plaqueamento em placa de ágar-sangue; F. Câmara de anerbiose para incubação bacteriana.

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

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

O presente estudo utilizou meios de cultura na forma de pó desidratado e suplementos seletivos pré-fabricados, que foram preparados de acordo com as orientações do fabricante (ANEXO 4).

#### **4.1.6. Isolamento e Identificação microbiana**

Depois do período de incubação, as placas de ágar-sangue com crescimento microbiano foram analisadas em Lupa Estereoscópica (LAMBDA LET 2, ATTO INSTRUMENTS CO., Hong Kong) em aumento de 3 vezes (FIG.5).

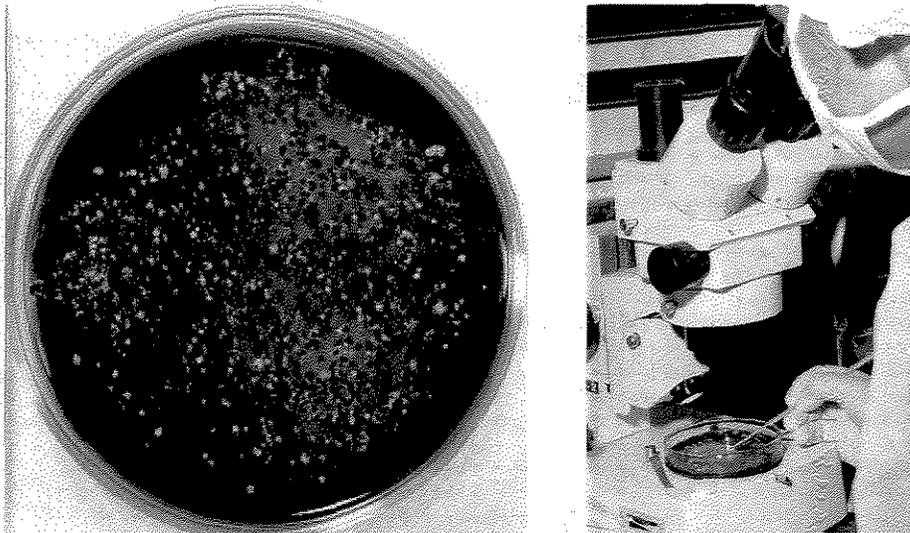


FIGURA 5- Avaliação das placas contendo ágar-sangue e crescimento bacteriano por meio da lupa estereoscópica, em aumento de 3 vezes.

As colônias bacterianas foram diferenciadas de acordo com suas características macroscópicas. O critério usado para selecionar diferentes colônias foi a sua aparência na placa observando-se forma, elevação, cor, textura, opacidade, tamanho e hemólise na placa inicial (FIG.6A).

Cada colônia bacteriana obtida na incubação anaeróbia foi plaqueada em duas placas contendo FAA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro pré-reduzidas por 2 dias, para ser avaliada o seu requerimento gasoso colocando-se uma placa na estufa de O<sub>2</sub> (FIG.6B) e outra na câmara de anaerobiose (FIG. 6C), e observando em qual condição gasosa houve crescimento bacteriano. As espécies que cresceram somente em incubação anaeróbia foram a seguir, novamente plaqueadas em ágar-sangue e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> e se nenhum crescimento foi observado, estas espécies foram consideradas anaeróbios estritos. Quando a espécie se proliferava tanto na estufa de cultura de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> como na

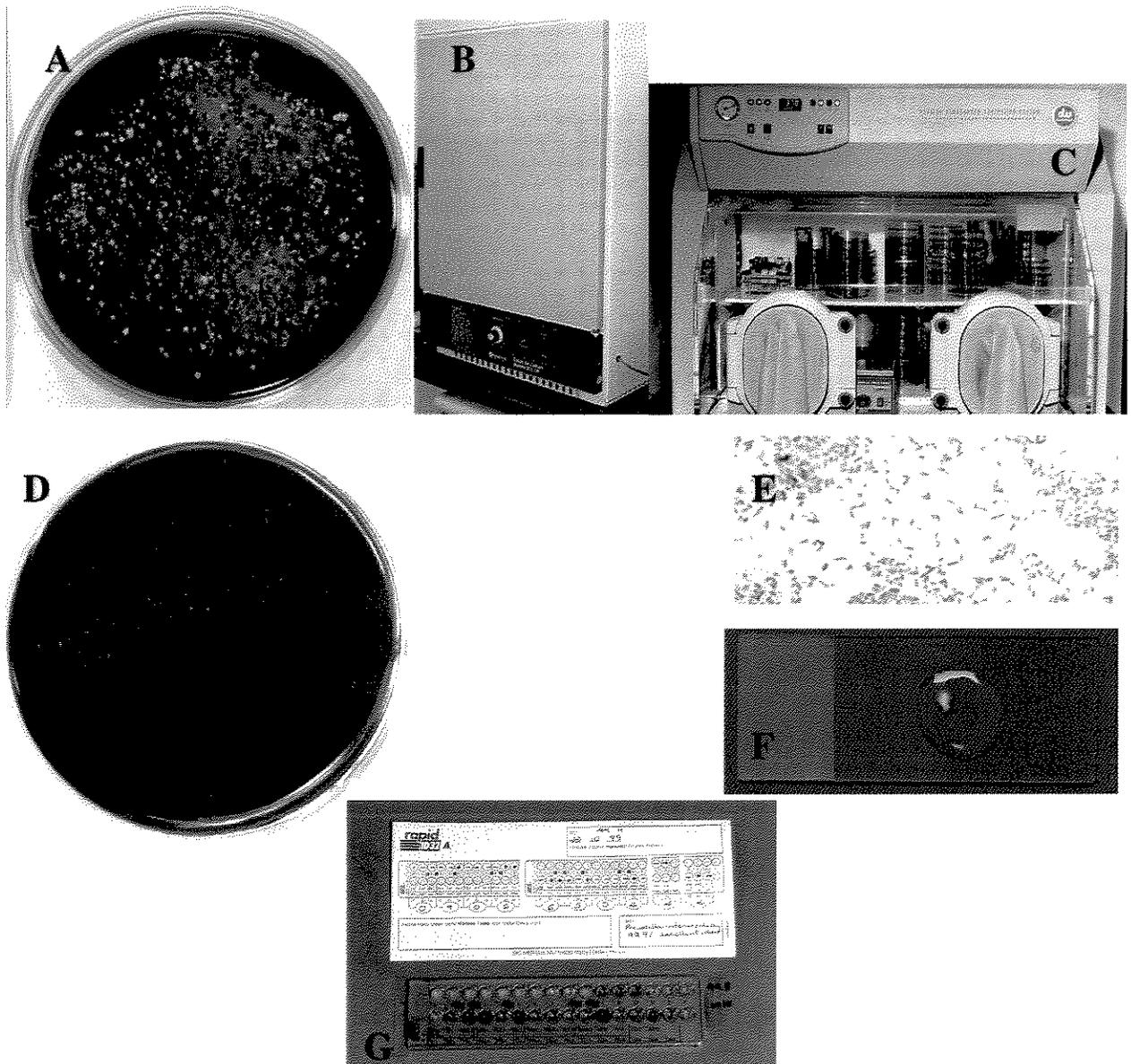
câmara de anaerobiose, esta foi considerada anaeróbia facultativa. Desta maneira, obtinha-se a cultura pura da espécie (FIG.6D).

Em seguida, as culturas puras foram inicialmente identificadas de acordo com o Método de Coloração de Gram observadas ao microscópio como células esféricas ou em forma de bastonetes (Gram-positiva – coloração roxa ou Gram-negativa – coloração vermelha) (FIG. 6E). Por fim, realizou-se o teste da Produção da Catalase (positiva indicada pela formação de bolhas ao contato com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou negativa sem formação de bolhas) (FIG.6F).

#### **4.1.7. Especiação microbiana**

Após a obtenção das informações básicas de cada colônia estudada, foram realizados os testes de identificação padronizados utilizando os kits bioquímicos (FIG.6G), para a especiação primária dos organismos isolados (ANEXO 5):

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



**FIGURA 6-** Procedimentos utilizados durante a análise microbiológica. A. Cultura Inicial; B e C. Avaliação do requerimento gasoso com a estufa de O<sub>2</sub> e com a câmara de anaerobiose; D. Cultura pura; E. Morfologia microscópica utilizando-se o método de coloração de Gram; F. Teste de produção de catalase com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; G. Ficha do "kit" de identificação utilizada na verificação da especiação bacteriana.

Após obtenção dos dados morfológicos, para as bactérias de pigmento negro (*Porphyromonas* e *Prevotella*), além da identificação microbiana com auxílio dos testes bioquímicos comerciais, foram também realizados testes adicionais (FIG. 7 e ANEXO 6) como:

- Fluorescência das colônias sob luz UV com 360nm de comprimento de onda (no caso de fluorescência negativa, a confirmação foi realizada através da utilização de metanol (MERK) que foi colocado em contato com o microrganismo e observado se existia a produção de fluorescência vermelha) (FIG. 7A);
- Fermentação de lactose utilizando o substrato 4-metilumbeliferil-b-D-galactosidase (MUG) (SIGMA) conforme a técnica descrita por ALCOFORADO *et al.* (1987). (FIG.7B);
- Atividade da tripsina utilizando o composto sintético fluorogênico L-arginina7-amino-4-metilcoumarina amido-HCl (CAAM) (SIGMA) aplicando-se a técnica de NAKAMURA *et al.* (1984) e SLOTS (1987) (FIG.7C).

Para aplicação dos testes adicionais, alíquotas de 20 µL das soluções de MUG e CAAM foram dispensadas em placas sobre as colônias bacterianas com morfologia característica para a identificação de *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella corporis*, *Prevotella denticola* e *Prevotella loescheii*.

Como controle para os testes adicionais, espécies padrão foram utilizadas como parâmetro para o comportamento dos isolados clínicos de pigmentação negra. Foram elas a seguir: *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277; *Porphyromonas endodontalis* ATCC 35406, *Porphyromonas asaccarolytica* ATCC 25260, *Prevotella intermedia* ATCC 25611, *Prevotella nigrescens* ATCC 33536, *Prevotella melaninogenica* ATCC 25845, *Prevotella loescheii* ATCC 15930, *Prevotella corporis* ATCC 33547 e *Prevotella denticola* ATCC 33185. Convém ressaltar que *Prevotella intermedia* e *Prevotella nigrescens* são fenotipicamente iguais.

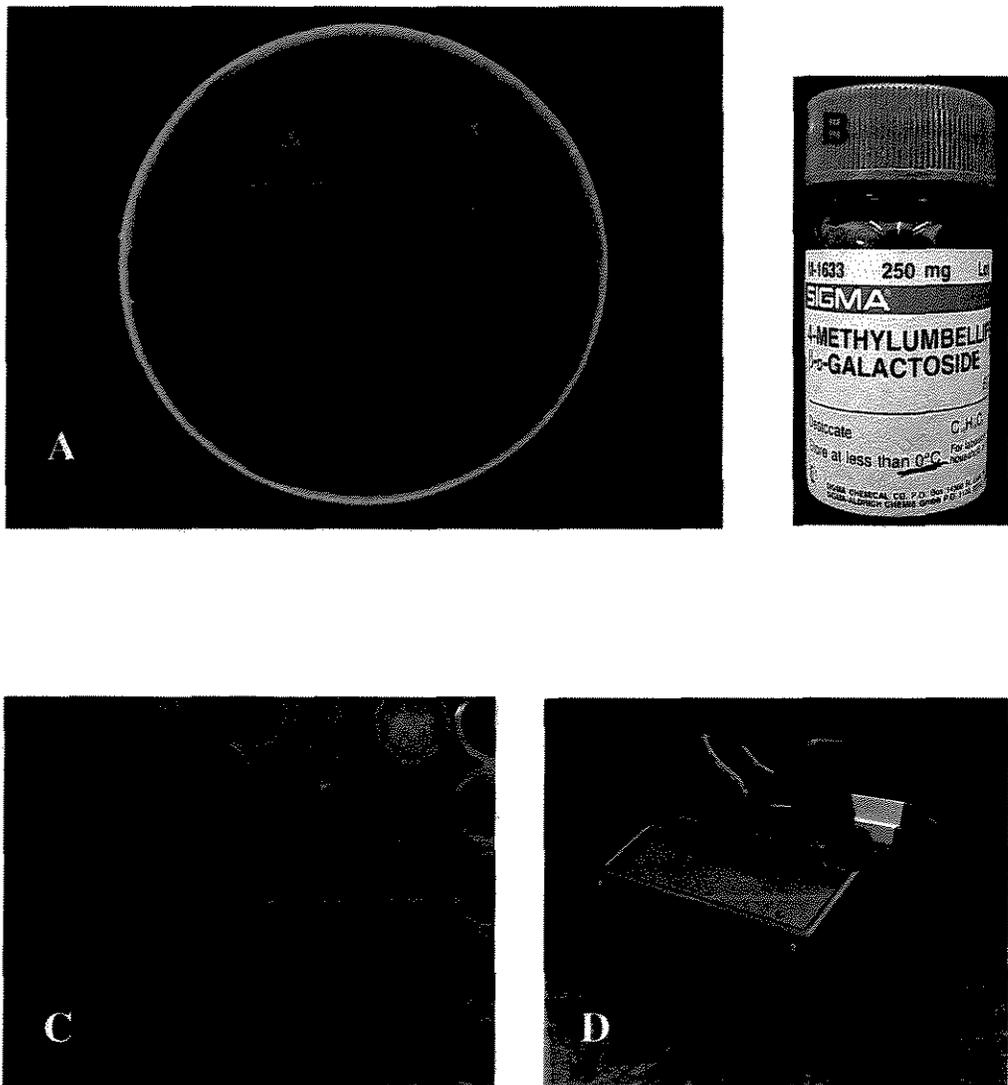


FIGURA 7- Testes adicionais para os microrganismos pigmentados de negro; A. Fluorescência das colônias sob luz UV; B. Fermentação de lactose-MUG; C. Atividade da tripsina-CAAM; D. Aparelho utilizado para visualização das fluorescências.

#### 4.1.8. *Análise estatística*

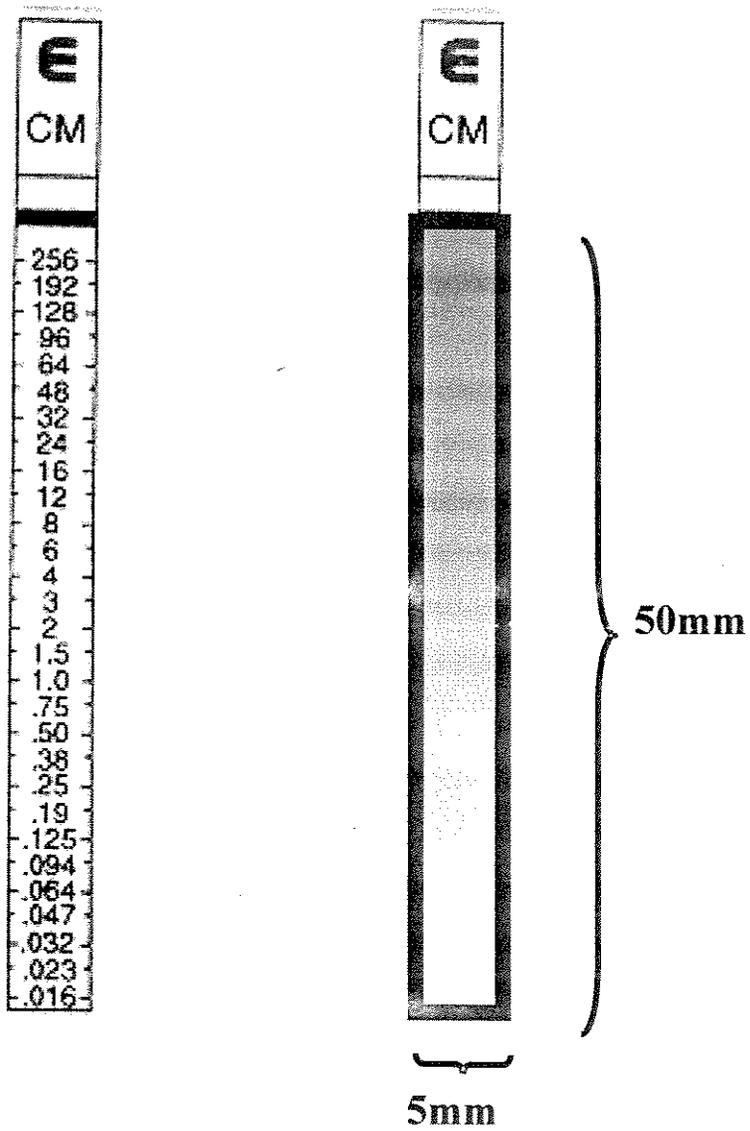
Os dados coletados foram colocados em uma planilha de cálculo (QUATTRO PRO, Bordland International Inc., Scotts Valley, CA, EUA) e estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, EUA). O teste de Pearson-qui quadrado ou o teste exato de Fisher foram utilizados para observar a relação entre a localização clínica do abscesso periapical com espécies bacterianas específicas. Além disso, os sinais e sintomas de origem endodôntica também foram relacionados, da mesma maneira, às espécies bacterianas.

#### 4.2. **Análise da suscetibilidade antimicrobiana**

##### 4.2.1 *“Epsilometer Test”- E-test*

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

Foi utilizado um teste baseado em técnicas de diluição e de difusão em ágar, o *E-test* (AB BIODISK, Solna-Suécia) (FIG.8).



FRENTE da fita (8A)

VERSO da fita (8B)

FIGURA 8- Fita de *E-test*. A. FRENTE; B. Esquema do gradiente exponencial do antibiótico (VERSO).

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

Para a realização do teste foi preparado o inóculo (meio em caldo + bactéria), com a espécie bacteriana previamente incubada em placas contendo FAA (Fastidious Anaerobe Agar) + 5% de sangue desfibrinado de carneiro (FIG.9A) na câmara de anaerobiose. Após 72 horas de incubação, as colônias bacterianas foram transferidas para tubos contendo o meio em caldo FAB (Fastidious Anaerobe broth) (FIG. 9B), em seguida agitado por 1 minuto (FIG. 9C), para atingir a turbidez equivalente ao padrão 1 de Mc Farland (NEFELOBAC, PROBAC – São Paulo-SP- Brasil), padrão indicado para bactérias anaeróbias estritas (AB BIODISK, 2000). Este procedimento foi realizado utilizando-se o aparelho Espectrofotômetro (MARCONI, São Paulo-SP, Brasil) (FIG.9D).

A seguir, foi realizado o repique das espécies bacterianas em placas pré-reduzidas, contendo 600mL de Brucella Ágar (OXOID, Hampshire-Inglaterra), 5% de sangue desfibrinado de carneiro, 600µL de vitamina K e 600µL de hemina para o adequado crescimento das bactérias anaeróbias estritas (ANEXO 4), com 4mm de espessura de meio. A semeadura foi realizada em toda extensão da placa uniformemente utilizando “swab” estéril, que foi umedecido na suspensão bacteriana (FIG.9E). Finalizada esta etapa, esperou-se de 10 a 15 min. para a secagem das placas. As fitas de *E-test*, previamente removidas do congelador e mantidas em temperatura ambiente por 20 minutos, foram distribuídas nas placas contendo Brucella-sangue (FIG.9F). Para este procedimento foram utilizadas pinças estéreis, 1 para cada fita de antibiótico testado. O experimento foi executado em duplicata e em câmara de fluxo laminar (MARCONI, São Paulo, Brasil).

As placas foram então levadas à câmara de anaerobiose a 37°C em atmosfera de 10% $H_2$ , 10% $CO_2$  e 80% $N_2$ . Após, foi realizada a leitura com 24 e 48 horas de incubação. Os valores das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) foram determinados no ponto de

intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do *E-test*, considerando o ponto de intersecção a inibição completa de crescimento bacteriano (FIG.10A-B).

A interpretação dos valores das CIMs das fitas de *E-test* em diferentes categorias de sensibilidade, foi realizada de acordo com o guia de interpretação da NCCLS (*National Commitee for Clinical Laboratory Standards*). Os microrganismos foram considerados sensíveis quando apresentavam concentrações inibitórias mínimas nos seguintes valores: para benzilpenicilina  $\leq 0.5\mu\text{g/mL}$ ; amoxicilina  $\leq 4\mu\text{g/mL}$ ; amoxicilina/clavulanato de potássio  $\leq 2\mu\text{g/mL}$ ; metronidazol  $\leq 8\mu\text{g/mL}$  e clindamicina  $\leq 2\mu\text{g/mL}$ . Embora as CIMs da azitromicina e eritromicina para as bactérias anaeróbias estritas não foram ainda determinadas pela NCCLS M100 S8/M11 A4, estes antibióticos foram testados e os valores de CIM para bactérias sensíveis foram  $\leq 4\mu\text{g/mL}$  (SPANGLER & APPELBAUM, 1993 e KURIYAMA *et al.*, 2000) e  $\leq 8\mu\text{g/mL}$  para o antibiótico cefaclor (CULLMAN *et al.*, 1993).

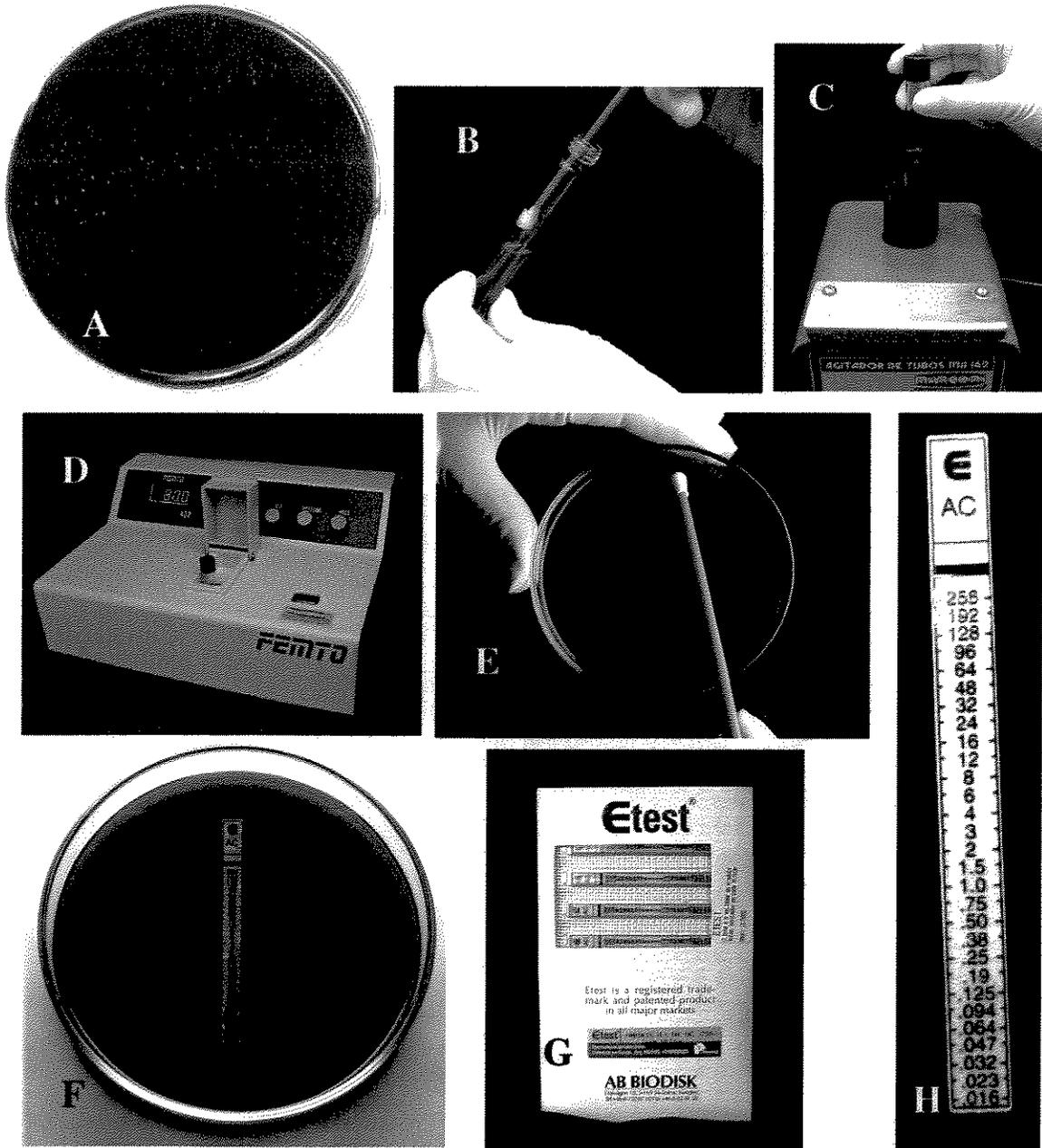


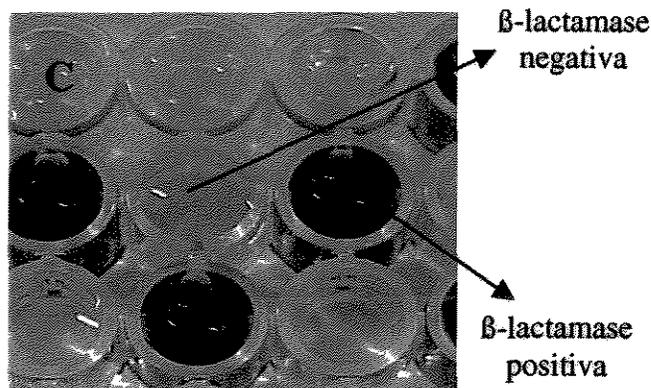
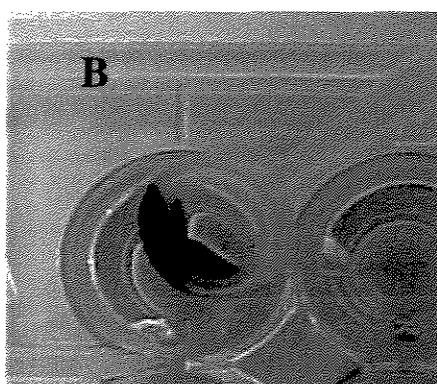
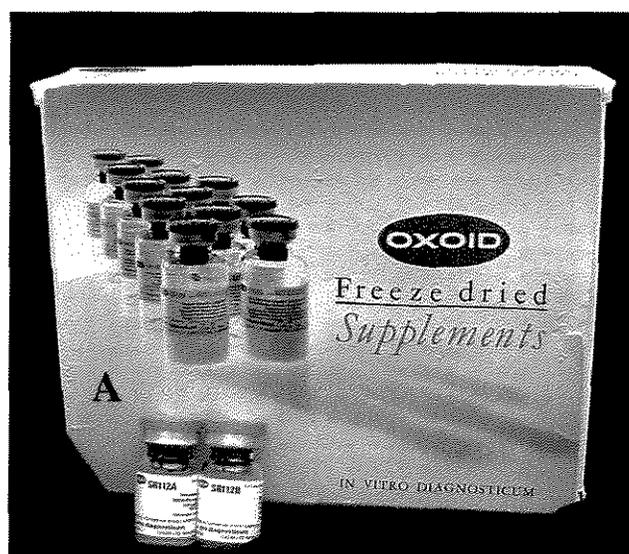
FIGURA 9- Procedimentos utilizados durante a análise da suscetibilidade antimicrobiana com o *E-test*. A. Cultura pura; B. Preparo do inóculo bacteriano; C. Agitação do inóculo; D. verificação da turbidez do meio no espectrofotômetro; E. inoculação na placa de ágar-sangue; F. Placa com a fita do *E-test*; G. Embalagem da fita do *E-test*; H. Fita do *E-test*.



FIGURA 10- Placa utilizada na avaliação do *E-test*. A. Placa com crescimento bacteriano (*Prevotella intermedia*) e a fita de *E-test* (eritromicina); B. Aumento da figura 10A, mostrando com a seta, o ponto de intersecção entre o halo de completa inibição bacteriana e a fita de *E-test*.

#### **4.2.2. Teste de $\beta$ -lactamase**

Para este teste utilizou-se Nitrocefim (Glaxo Research 87/312) – Oxoid , Hampshire – UK (FIG. 11A), de maneira que o conteúdo do vidro de nitrocefim liofilizado SR112 foi agregado ao conteúdo do vidro de líquido de rehidratação SR 112A. Foram adicionados 20 $\mu$ L da solução de nitrocefim em um recipiente limpo. Com uma alça estéril, a espécie bacteriana a ser testada foi colocada nos 20 $\mu$ L de nitrocefim (FIG.11B) e imediatamente o recipiente com nitrocefim + espécie bacteriana foi levado para a estufa a 37°C e mantido por um período de 30 minutos (FIG.11C). A seguir o resultado foi observado através da mudança da cor amarela para vermelho quando a reação foi positiva para a  $\beta$ -lactamase, e quando foi negativa nenhuma alteração foi observada.



$\beta$ -lactamase  
negativa

$\beta$ -lactamase  
positiva

FIGURA 11- Procedimento utilizado durante o teste de  $\beta$ -lactamase. A. Embalagem e recipientes do Nitrocefina; B. Espécie bacteriana (*Prevotella intermedia*) sendo depositada na solução de nitrocefina; C. Reação da  $\beta$ -lactamase após 30 minutos em estufa a 37°C.

## 5 RESULTADOS

### 5.1. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais

#### 5.1.1. *Composição da microbiota de canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais e frequência de dados clínicos*

Dos 60 dentes associados com abscessos periapicais, 33 possuíam restaurações (8 provisórias e 25 definitivas), 18 dentes estavam cariados, 8 dentes com a câmara pulpar exposta ao meio bucal e 3 dentes eram hígidos. Além disso, 56 dentes se encontraram com polpa necrótica e 4 com tratamento endodôntico prévio. Os grupos dentais envolvidos foram: incisivos (30/60); pré-molares (17/60); molares (9/60) e caninos (4/60), totalizando 38 dentes superiores e 22 inferiores.

Duzentos e oitenta e sete isolados microbianos foram recuperados dos 60 canais radiculares examinados, indicando uma média de 4,8 cepas por canal radicular. Ausência de crescimento microbiano viável ocorreu em somente um canal (1/60) (TAB.5 e ANEXO-TAB. 14).

Dos 287 isolados, 201 foram identificados como anaeróbios estritos, e 86 como anaeróbios facultativos, 99 sendo Gram-negativos e 188 Gram-positivos (FIG.12, TAB.6 e ANEXO-TAB.14), pertenciam a 24 diferentes gêneros (FIG. 14).

Dos canais radiculares investigados 90% (54) apresentaram bactérias anaeróbias estritas e 76,6% (46) bactérias anaeróbias facultativas. Bactérias Gram-negativas foram recuperadas em 75% (45) dos canais radiculares e Gram-positivas em 98,3% (59) (FIG.12 e TAB.6 e ANEXO-TAB.14).

Uma ou mais (máximo de 14) espécies bacterianas foram recuperadas de 98,3% (59) canais radiculares, mostrando a característica polimicrobiana das infecções dentais (TAB.5 e ANEXO-TAB.14).

Dos 60 casos investigados, apresentaram dor espontânea em 53 casos, dor à percussão (53/60), dor à palpação (52/60), edema (45/60), fistula (10/60), lesão periapical (45/60), exsudato purulento (35/60), exsudato hemorrágico (5/60), exsudato claro (11/60) (ANEXO-TAB.13).

Dor espontânea estava associada com 53 canais, dos quais 50 apresentaram polpa necrótica e 3 com tratamento endodôntico prévio. Destes casos, havia presença de exsudato purulento em 30 canais radiculares e edema em 42. Anaeróbios estritos foram encontrados em 70,8% dos canais com dor espontânea, sendo que 1 canal (com polpa necrosada) não apresentou crescimento bacteriano viável. Duzentos e cinquenta e sete cepas bacterianas foram encontradas em canais com dor espontânea. O número de espécies por canal variou de 0 a 14, com média de 4,8 cepas por canal (ANEXO-TAB.13 e 14).

Edema estava associado com 45 casos, dos quais 44 apresentaram polpa necrótica e somente 1 com tratamento endodôntico prévio. Anaeróbios estritos foram encontrados em 70,2% dos canais radiculares dos quais os pacientes estavam com edema. Todos os canais radiculares com edema apresentaram crescimento bacteriano viável. Duzentos e vinte e oito cepas bacterianas foram encontradas em canais com edema. O número de espécies por canal variou de 1 a 14, com média de 5,1 cepas por canal (ANEXO-TAB.13 e 14).

Exsudato purulento estava presente em 35 canais, dos quais 32 apresentaram polpa necrótica e 3 com tratamento endodôntico prévio. Anaeróbios estritos foram encontrados em 70% dos canais com exsudato purulento, sendo que todos os canais radiculares apresentaram crescimento bacteriano viável. Cento e oitenta e três cepas

bacterianas foram encontradas em canais com exsudato purulento. O número de espécies por canal variou de 1 a 14, com média de 5,2 espécies por canal (ANEXO-TAB.13 e14).

O único canal radicular onde não se conseguiu recuperar microrganismos viáveis apresentava-se necrosado. O dente estava cariado e o paciente apresentava dor espontânea, dor à palpação e sensibilidade à percussão. Estava associado a um abscesso subperiosteal (ANEXO-TAB.14).

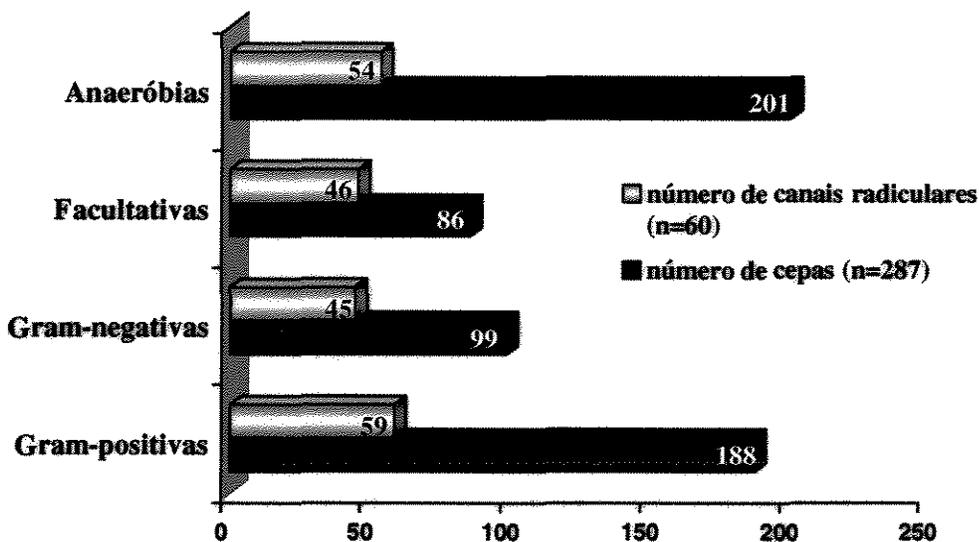


FIGURA 12- Composição da microbiota dos canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais.

Não foram isolados microrganismos anaeróbios estritos viáveis em 6/60 casos, sendo 2 com tratamento endodôntico prévio e incluindo o único caso sem crescimento microbiano viável. Em 14 canais radiculares não se observou a presença de microrganismos facultativos viáveis, sendo 1 canal com tratamento endodôntico prévio.

Os microrganismos anaeróbios estritos predominantes encontrados foram *Peptostreptococcus prevotii* (22/60), *Peptostreptococcus micros* (19/60), *Fusobacterium necrophorum* (19/60), *Prevotella intermedia/nigrescens* (16/60), *Fusobacterium nucleatum* (12/60) e *Streptococcus constellatus* (12/60) (FIG.13, TAB.6 e ANEXO-TAB.14).

Embora menos freqüentes, bactérias anaeróbias facultativas, tais como *Gemella morbillorum* (19/60), *Streptococcus mitis* (13/60), *Streptococcus sanguis* (11/60), também foram encontradas (FIG.13, TAB.6 e ANEXO-TAB.14).

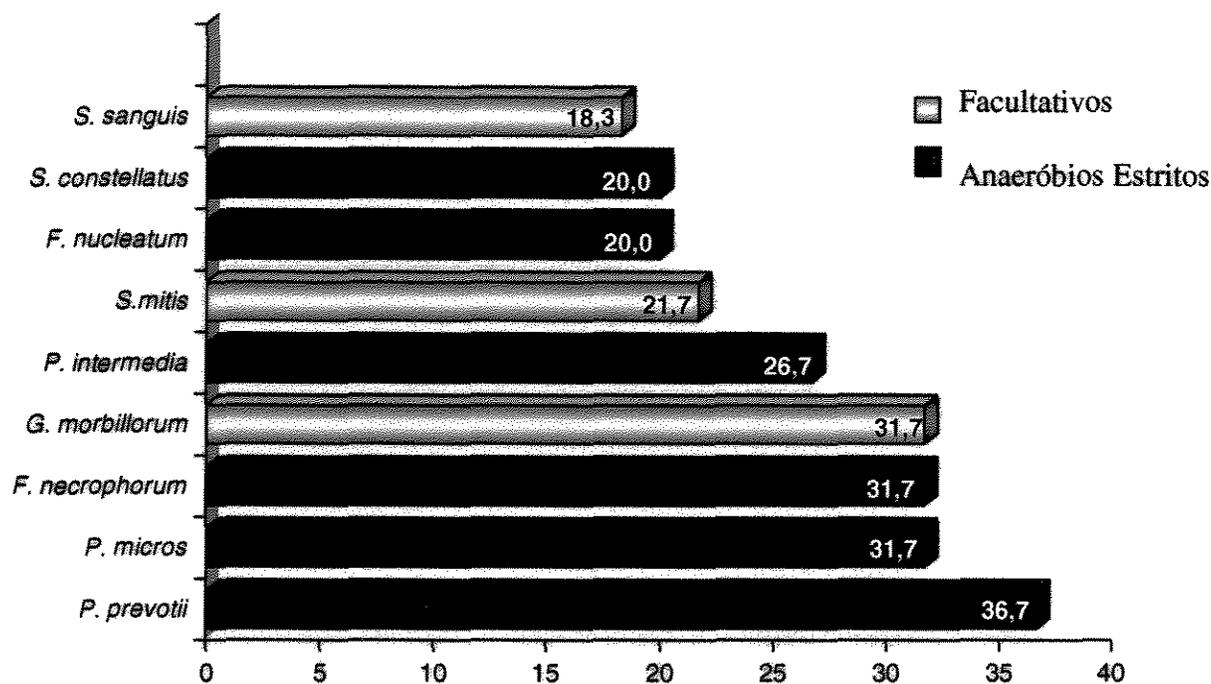


FIGURA 13 – Prevalência das espécies bacterianas (% de casos) (n=60).

Bacilos produtores de pigmento negro foram encontrados em 20 canais radiculares, todos com polpa necrosada, totalizando 30 cepas. Corresponderam às espécies *Prevotella intermedia/nigrescens* (16/20), *Prevotella corporis* (6/20), *Prevotella loescheii* (3/20) e *Prevotella melaninogenica* (3/20) e *Porphyromonas gingivalis* (1/20) (ANEXO-TAB.13 e 14).

Espécies de estreptococos foram encontradas em 37 canais radiculares no total de 38 cepas, sendo que em 33 canais a polpa estava necrosada e 4 canais apresentavam tratamento endodôntico prévio. Correspondiam às espécies *Streptococcus mitis* (13/37), *Streptococcus constellatus* (12/37), *Streptococcus sanguis* (11/37), *Streptococcus oralis* (6/37), *Streptococcus anginosus* (3/37), *Streptococcus acidominus* (2/37), *Streptococcus intermedius* (1/37), *Streptococcus salivarius* (1/37) e *Streptococcus mutans* (1/37) (ANEXO-TAB.13 e 14).

TABELA 5

Frequência do número de cepas bacterianas encontradas por canais radiculares infectados associados com abscessos periapicais

Espécie por canal Radicular	Frequência (n=60)	%
0(sem crescimento)	1	01,6
1	4	06,6
2	3	05,0
3	8	13,3
4	11	18,3
5	13	21,6
6	12	20,0
7	3	05,0
8	1	01,6
9	1	01,6
10	2	03,3
14	1	01,6

TABELA 6

Composição da microbiota de canais radiculares associados a abscessos periapicais

Microrganismos	Gram – ou +	Requerimento Gasoso	Nº *	%*
<i>Peptostreptococcus prevotii</i>	+	Anaeróbio	22	36,7
<i>Peptostreptococcus micros</i>	+	Anaeróbio	19	31,7
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	-	Anaeróbio	19	31,7
<i>Gemella morbillorum</i>	+	Facultativo	19	31,7
<i>Prevotella intermedia/nigrescens</i>	-	Anaeróbio	16	26,7
<i>Streptococcus mitis</i>	+	Facultativo	13	21,7
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	-	Anaeróbio	12	20,0
<i>Streptococcus constellatus</i>	+	Anaeróbio	12	20,0
<i>Streptococcus sanguis</i>	+	Facultativo	11	18,3
<i>Eubacterium lentum</i>	+	Anaeróbio	8	13,3
<i>Veillonella</i> spp.	-	Anaeróbio	7	11,7
<i>Prevotella corporis</i>	-	Anaeróbio	6	10,0
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	+	Anaeróbio	6	10,0
<i>Streptococcus oralis</i>	+	Facultativo	6	10,0
<i>Prevotella buccae</i>	-	Anaeróbio	5	08,3
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	-	Anaeróbio	5	08,3
<i>Gemella haemolysans</i>	+	Facultativo	5	08,3
<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	+	Anaeróbio	4	06,6
<i>Tissierella praeacuta</i>	-	Anaeróbio	4	06,6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	Facultativo	4	06,6
<i>Cardiobacterium hominis</i>	-	Facultativo	4	06,6
<i>Prevotella melaninogenica</i>	-	Anaeróbio	3	05,0
<i>Prevotella loescheii</i>	-	Anaeróbio	3	05,0
<i>Eubacterium limosum</i>	+	Anaeróbio	3	05,0
<i>Actinomyces viscosus</i>	+	Facultativo	3	05,0
<i>Clostridium difficile</i>	+	Anaeróbio	3	05,0
<i>Streptococcus anginosus</i>	+	Facultativo	3	05,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	Facultativo	3	05,0
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	+	Anaeróbio	3	05,0
<i>Prevotella oris</i>	-	Anaeróbio	2	03,3
<i>Prevotella oralis</i>	-	Anaeróbio	2	03,3
<i>Bacteroides gracilis</i>	-	Anaeróbio	2	03,3
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	+	Anaeróbio	2	03,3
<i>Peptostrep. asaccharolyticus</i>	+	Anaeróbio	2	03,3
<i>Actinomyces naeslundii</i>	+	Facultativo	2	03,3
<i>Clostridium subterminale</i>	+	Anaeróbio	2	03,3
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	+	Facultativo	2	03,3
<i>Propionibacterium acnes</i>	+	Anaeróbio	2	03,3
<i>Streptococcus acidominus</i>	+	Facultativo	2	03,3
<i>Bifidobacterium</i> spp.	+	Anaeróbio	2	03,3
<i>Neisseria</i> spp.	-	Facultativo	2	03,3

\* Canais radiculares

Os seguintes isolados foram encontrados em um único canal radicular:

*Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Prevotella bivia*, *Prevotella*

spp., *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus indolicus*, *Peptostreptococcus tetradius*, *Eubacterium aerofaciens*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Actinomyces odontolyticus*, *Clostridium acetobulyticum*, *Clostridium hastiforme*, *Clostridium butyricum*, *Clostridium novyiA*, *Clostridium cratidioforme*, *Clostridium limosum*, *Clostridium innocum*, *Clostridium bifermentans*, *Clostridium* spp., *Lactobacillus minute*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus* spp., *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecium*, *Aerococcus viridans*, *Staphylococcus lentus*, *Capnocytophaga* spp., *Micrococcus* spp., *Wolinella* spp. .

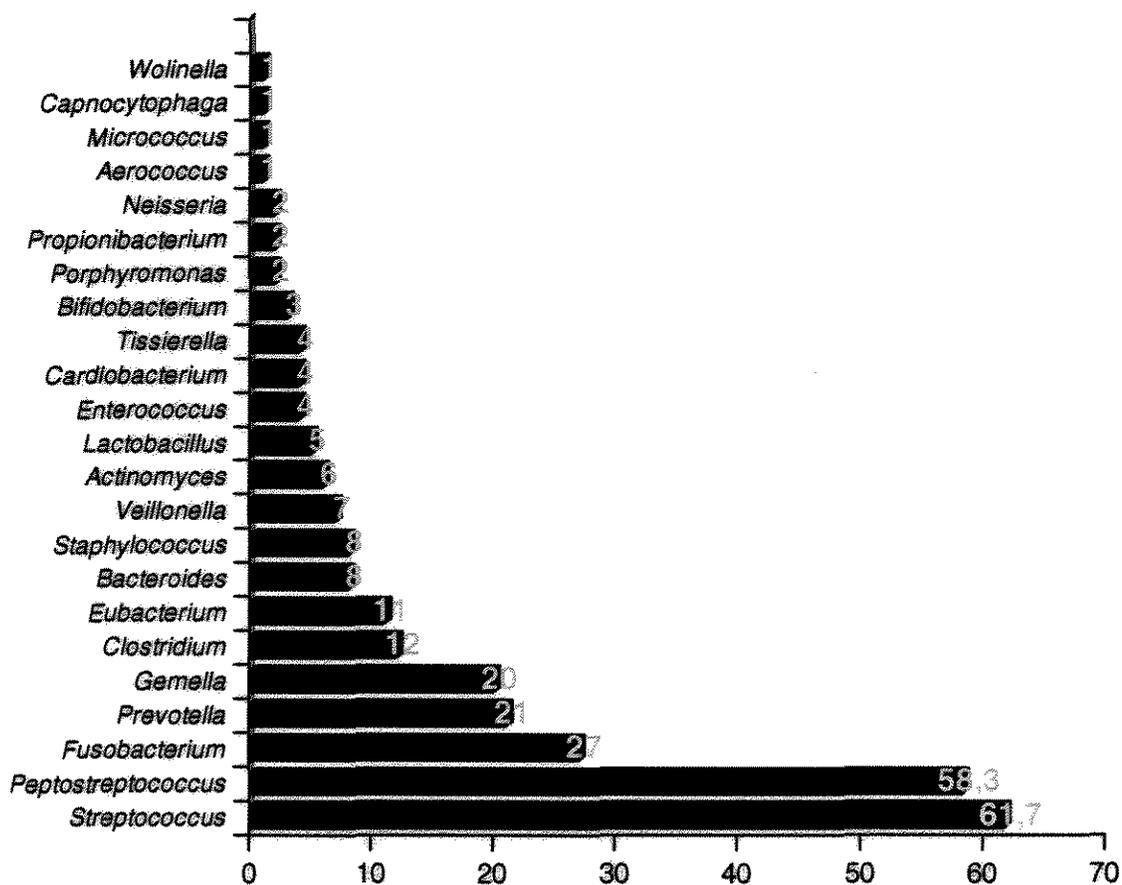


FIGURA 14 – Prevalência dos gêneros bacterianos isolados de 60 canais radiculares com abscessos periapicais (%).

### 5.1.2. *Frequência da localização clínica dos abscessos periapicais*

Do total de 60 canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais investigados, nenhum se encontrava na fase primária (intra-óssea); 9 na fase subperiosteia; 39 na fase submucosa, sendo 31 difusos e 8 localizados; 10 na fase de fistulização, sendo destes, 9 com fistula intra-oral e 1 com fistula extra-oral e 2 foram diagnosticados como fênix. Não foram examinados abscessos extra-orais, pois estes são atendidos no centro cirúrgico, impossibilitando a realização da coleta microbiológica sem o paciente ter recebido antibioticoterapia (TAB. 7).

TABELA 7  
Frequência dos abscessos periapicais quanto a localização (n=60).

Classificação	Número	%
PRIMÁRIO (INTRA-ÓSSEO)	00	00,0
SUBPERIÓSTEO	09	15,0
SUBMUCOSO	39	65,0
Difuso	31	51,6
Localizado	08	13,3
FISTULIZAÇÃO	010	16,7
Intra-oral (fistula)	09	15,0
Extra-oral (fistula)	01	01,7
FÊNIX	02	03,3
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100</b>

### 5.1.3. *Correlação entre espécies bacterianas específicas e a localização clínica dos abscessos periapicais e entre os diferentes sinais e sintomas*

Através da análise estatística observou-se que houve correlação positiva significativa entre o Abscesso submucoso (n=39) com a espécie *Peptostreptococcus prevotii* (n=22) ( $p < 0,05$ ) e entre abscesso submucoso localizado (n=8) com a espécie *Peptostreptococcus anaerobius* (n=6) ( $p < 0,05$ ).

Associações foram encontradas entre a presença de edema (n=45) com *Peptostreptococcus* sp. (n=35), com *Gemella* sp. (n=20) e com a espécie *Gemella morbillorum* (n=19) (p< 0,05 para todos). Também foi observada correlação positiva entre a presença de exsudato purulento no canal radicular (n=35) com a espécie *Peptostreptococcus prevotii* (n=22) (p<0,05).

## 5.2. Análise da suscetibilidade antimicrobiana

### 5.2.1. Epsilometer test (E-test)

As espécies de *Peptostreptococcus prevotii* mostraram suscetibilidade em 100% aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato de potássio, cefaclor e clindamicina, e suscetibilidade em 83,3% aos antibióticos metronidazol, azitromicina e eritromicina (TAB. 8).

TABELA 8  
Perfil de sensibilidade do microrganismo *P. prevotii*.

<i>Peptostreptococcus prevotii</i> (n=12)					
Agente antimicrobiano	CIM (µg/mL) <sup>a</sup>		Referência*	Variação da CIM	Suscetibilidade
	50%	90%			
Benzilpenicilina	0,016	0,016	0,5	<0,016-0,38	100%
Amoxicilina	0,094	0,19	4,0	0,016-0,25	100%
Amoxicilina + clavulanato	0,064	0,125	2,0	0,016-0,19	100%
Metronidazol	0,125	0,38	8,0	0,016->256	83,3%
Cefaclor	0,19	1,0	8,0	0,064 – 1,0	100%
Clindamicina	0,016	0,50	2,0	0,016-0,50	100%
Eritromicina	1,0	1,0	4,0	0,016-64	83,3%
Azitromicina	0,75	1,5	4,0	<0,016-8	83,3%

<sup>a</sup> 50% e 90% os quais, 50% e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente.

\*NCCLS e SPANGLER & APPELBAUM, 1993; KURIYAMA *et al.*, 2000; CULLMAN *et al.*, 1993.

As espécies de *Fusobacterium necrophorum* revelaram suscetibilidade em 100% aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato de potássio, cefaclor

e clindamicina, e suscetibilidade em 90,9% aos antibióticos metronidazol e azitromicina e ainda em 63,3% de suscetibilidade a eritromicina (TAB. 9).

TABELA 9  
Perfil de sensibilidade do microrganismo *Fusobacterium necrophorum*.

<i>Fusobacterium necrophorum</i> (n=11)					
Agente antimicrobiano	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>		Referência*	Variação da CIM	Suscetibilidade
	50%	90%			
Benzilpenicilina	0,016	0,38	0,5	<0,016-0,038	100%
Amoxicilina	0,047	0,75	4,0	<0,016-3,0	100%
Amoxicilina + clavulanato	0,016	0,75	2,0	<0,016-0,75	100%
Metronidazol	0,023	0,047	8,0	<0,016-256	90,9%
Cefaclor	0,25	2,0	8,0	<0,016 – 4,0	100%
Clindamicina	0,023	1,0	2,0	<0,016-1,0	100%
Eritromicina	8,0	>256	4,0	0,047->256	63,6%
Azitromicina	0,38	1,0	4,0	<0,016-128	90,9%

<sup>a</sup> 50% e 90% os quais, 50% e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente.

\*NCCLS e SPANGLER & APPELBAUM, 1993; KURIYAMA *et al.*, 2000; CULLMAN *et al.*, 1993.

As espécies de *Fusobacterium nucleatum* revelaram sensibilidade em 100% aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato de potássio, cefaclor, clindamicina e metronidazol, e em 90% ao azitromicina e ainda somente em 10% a eritromicina (TAB.10).

TABELA 10  
Perfil de sensibilidade do microrganismo *Fusobacterium nucleatum*.

<i>Fusobacterium nucleatum</i> (n=10)					
Agente antimicrobiano	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>		Referência*	Variação da CIM	Suscetibilidade
	50%	90%			
Benzilpenicilina	0,023	0,047	0,5	<0,016-0,064	100%
Amoxicilina	0,032	0,047	4,0	0,016-0,25	100%
Amoxicilina + clavulanato	0,032	0,50	2,0	0,016-0,50	100%
Metronidazol	0,016	0,016	8,0	<0,016-0,016	100%
Cefaclor	0,50	1,0	8,0	0,016-1,5	100%
Clindamicina	0,023	0,064	2,0	<0,016-0,19	100%
Eritromicina	0,38	>256	4,0	0,38->256	10%
Azitromicina	3,0	4,0	4,0	1,5-8	90%

<sup>a</sup> 50% e 90% os quais, 50% e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente.

\*NCCLS e SPANGLER & APPELBAUM, 1993; KURIYAMA *et al.*, 2000; CULLMAN *et al.*, 1993.

As espécies de *Peptostreptococcus micros* e *Prevotella intermedia* mostraram-se sensíveis em 100% aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato de potássio, cefaclor, clindamicina, metronidazol, azitromicina e eritromicina (TAB.11 e 12).

TABELA 11  
Perfil de sensibilidade do microrganismo *Peptostreptococcus micros*.

<i>Peptostreptococcus micros</i> (n=5)					
Agente antimicrobiano	CIM (µg/mL) <sup>a</sup>		Referência*	Variação da CIM	Suscetibilidade
	50%	90%			
Benzilpenicilina	0,023	0,023	0,5	0,016-0,023	100%
Amoxicilina	0,064	0,064	4,0	0,047-0,064	100%
Amoxicilina + clavulanato	0,064	0,064	2,0	0,047-0,19	100%
Metronidazol	0,125	0,125	8,0	0,125-0,125	100%
Cefaclor	1,0	1,5	8,0	0,023 – 2,0	100%
Clindamicina	0,125	0,50	2,0	0,016-0,50	100%
Eritromicina	1,0	1,5	4,0	0,016 – 2,0	100%
Azitromicina	0,75	1,0	4,0	0,75 – 1,0	100%

<sup>a</sup> 50% e 90% os quais, 50% e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente.

\*NCCLS e SPANGLER & APPELBAUM, 1993; KURIYAMA *et al.*, 2000; CULLMAN *et al.*, 1993.

TABELA 12  
Perfil de sensibilidade do microrganismo *Prevotella intermedia*.

<i>Prevotella intermedia</i> (n=10)					
Agente antimicrobiano	CIM (µg/mL) <sup>a</sup>		Referência*	Variação da CIM	Suscetibilidade
	50%	90%			
Benzilpenicilina	0,016	0,064	0,5	<0,016-0,094	100%
Amoxicilina	0,023	0,032	4,0	0,016-0,032	100%
Amoxicilina + clavulanato	0,016	0,016	2,0	<0,016-0,016	100%
Metronidazol	0,023	0,032	8,0	<0,016-0,032	100%
Cefaclor	0,094	0,125	8,0	0,016-0,125	100%
Clindamicina	0,023	0,125	2,0	<0,016-0,19	100%
Eritromicina	0,094	1,5	4,0	0,016-2,0	100%
Azitromicina	0,032	0,032	4,0	0,016-3,0	100%

<sup>a</sup> 50% e 90% os quais, 50% e 90% dos isolados foram inibidos, respectivamente.

\*NCCLS e SPANGLER & APPELBAUM, 1993; KURIYAMA *et al.*, 2000; CULLMAN *et al.*, 1993.

Os valores das CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> referem-se às concentrações inibitórias mínimas que são efetivas contra 50% e 90% das espécies testadas. As TABELAS 8-12 também mostram o intervalo de CIM para cada antibiótico contra as espécies testadas, bem como o índice de suscetibilidade destas contra cada antibiótico.

#### *5.2.2. Teste de $\beta$ -lactamase*

As espécies que tiveram sua suscetibilidade antimicrobiana investigada também foram testadas quanto à produção de  $\beta$ -lactamase, sendo que todas as espécies mostraram reação negativa ao nitrocefim.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1. Análise microbiológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais

Foram utilizados métodos microbiológicos envolvendo inoculação das amostras em meios de transporte e, em seguida, em meios de cultura pré-reduzidos altamente nutritivos, que foram prontamente incubadas por tempo prolongado sob condições gasosas adequadas, para evitar a perda de microrganismos de crescimento lento e identificar o maior número de espécies bacterianas possíveis, inclusive anaeróbias estritas. Apesar de um grande número de espécies anaeróbias ter sido isolado neste estudo, é possível que algumas espécies muito sensíveis à presença de oxigênio não tenham sido identificadas.

O método de cultura tem sido tradicionalmente usado na avaliação da microbiota associada com várias doenças infecciosas, incluindo infecções de origem endodôntica (SUNDQVIST, 1976; YOSHIDA *et al.*, 1987; BROOK *et al.*, 1981; ADERHOLD *et al.*, 1981; OGUNTEBI *et al.*, 1982; WILLIAMS *et al.*, 1983; LABRIOLA *et al.*, 1983; WASFY *et al.*, 1992; GOMES, 1995; DOUGHERTY, *et al.* 1998; GOMES, 2002). Além disso, a maior vantagem da técnica de cultura é sua capacidade em detectar microrganismos inesperados, enquanto que procedimentos moleculares geralmente detectam espécies microbianas determinadas (PAPANOU *et al.*, 1997).

A cultura ainda pode ser utilizada principalmente para a determinação do padrão de sensibilidade antimicrobiana das bactérias patogênicas, que está sempre mudando com a possibilidade de selecionamento de bactérias resistentes, o que torna ainda mais importante tal monitoramento, permitindo o desenvolvimento de métodos de ação para um tratamento mais eficaz (FINEGOLD *et al.*, 1988; ROSENBLATT & BROOK, 1993; FORBES *et al.*, 1998).

Foi utilizado o método de cultura e o meio de transporte RTF para conservar os microrganismos das amostras durante o transporte até o laboratório de microbiologia da

Disciplina de Endodontia. O uso de meios de transporte preserva a viabilidade microbiana, inclusive dos anaeróbios, impedindo porém, sua proliferação (TRONSTAD *et al.*, 1987; GOMES, 1995). Esta propriedade é importante, pois além de permitir contagem fiel do número de células presentes no material clínico, impede que espécies facultativas proliferem excessivamente, mascarando o crescimento, muito mais lento, de anaeróbios (VAN STEENBERG *et al.*, 1982). Um meio de transporte bastante utilizado é o "Reduced Transport Fluid" (RTF), que é eficiente em manter a viabilidade e a contagem original de células até 24h em temperatura ambiente. Outro meio encontrado é Viability Medium Goteborg Agar (VMGA III) também eficaz para o transporte, no entanto, em até 4h (VAN STEENBERG *et al.*, 1982). Para SYED & LOESCHE (1972) o RTF parece ser um meio de transporte satisfatório para amostras dentais.

Porém, DAHLÉN *et al.* (1993) relataram que a recuperação de bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas pelo método de transporte fluido VMGA III foi melhor que o RTF. No estudo de GOMES (1995) discute-se que, com o desenvolvimento de técnicas anaeróbias, a recuperação de microrganismos da microbiota de canais radiculares através da amostragem em meios de transporte e cultivo tem resultados favoráveis. Em outros estudos, usando a técnica com meio de transporte para recuperar bactérias de canais radiculares (YOSHIDA *et al.*, 1987; WASFY *et al.*, 1992), alguns não obtiveram bactérias cultiváveis. Também, a direta inoculação da amostra da ponta de papel em meio sólido pré-reduzido, por vezes não é capaz de recuperar bactérias cultiváveis de alguns canais radiculares como relatado por GOMES *et al.* (1994a, b).

Entretanto, era de se esperar que os meios de cultura empregados não fossem apropriados para o crescimento de todos os microrganismos. Por exemplo, esperava-se que os espiroquetas e micoplasmas não sobrevivessem nos meios de cultura usados neste estudo, e realmente não foram isolados. Também o *Bacteroides forsythus* não foi isolado por ser um microrganismo extremamente difícil de se cultivar. Até o presente momento não existe uma única metodologia que seja capaz de isolar todos os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares infectados (GOMES, 2002).

Em apenas um canal radicular, o qual o dente encontrava-se cariado com polpa necrosada, não se conseguiu o cultivo de bactérias, podendo assim, indicar falha na técnica microbiológica ou número insuficiente de concentração microbiana. Semelhante a este trabalho, também em outros estudos (YOSHIDA *et al.*, 1987; HIRAI *et al.*, 1991; WASFY *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 1994a,b; GOMES *et al.*, 1996a,b,c; BAUMGARTNER *et al.*, 1999) não foram obtidas bactérias viáveis em algumas coletas de canais radiculares.

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

O isolamento das bactérias em placas pré-reduzidas com meios seletivos, auxiliou na identificação de muitas espécies bacterianas anaeróbias estritas totalizando 201 microrganismos. Em seguida, foi observada a reação de catalase, realizado o método de coloração de Gram para demonstrar os microrganismos predominantes e, finalizando, a identificação com a utilização dos “kits” comerciais.

O uso de “kits” comerciais para identificação pode não encontrar aprovação universal, mas evita problemas relacionados a variações interlaboratoriais. Também representa um sistema seguro, reproduzível e disponível para laboratórios relativamente não especializados, sendo um método acessível para análise microbiológica endodôntica (GOMES, 1995; GOMES, 2002).

A presença de restaurações (33/60 casos) ou de tratamento endodôntico prévio (4/60 casos) pode ter influenciado nos resultados microbiológicos, favorecendo o crescimento de Gram-positivos (188/287 cepas - n=60). Dos 56 casos com polpa necrosada, 31 apresentavam-se restaurados, com microinfiltração e 18 dentes cariados. Este é um dado importante uma vez que, *Porphyrromonas endodontalis* foi isolada e identificada pelo

método de cultura somente em dentes macroscopicamente intactos e com lesões periapicais (SUNDQVIST, 1992a; WASFY *et al.*, 1992), mas não de dentes com cáries avançadas na cavidade pulpar (HIRAI *et al.*, 1991). Os únicos critérios para que um caso não pudesse ser considerado neste trabalho foram pacientes que haviam recebido antibioticoterapia prévia de 6 meses, dentes que não se conseguiu realizar um correto isolamento absoluto seguido de uma descontaminação adequada e casos em que não foi possível alcançar um comprimento adequado do canal radicular durante a coleta das amostras. Entretanto, esta seleção é mais representativa das situações clínicas encontradas diariamente nos pacientes indicados para tratamento endodôntico. Cuidados foram tomados na descontaminação do dente, do campo operatório e da câmara pulpar antes da coleta microbiológica e também na neutralização dos agentes antimicrobianos para evitar falsos resultados.

Embora não se possa afirmar que exista uma correlação absoluta entre um microrganismo específico e um aspecto clínico e mesmo uma localização clínica de abscesso, o presente estudo mostrou não somente que anaeróbios estritos são importantes componentes da microbiota de canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais, mas também, que anaeróbios específicos como *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium necrophorum*, *Fusobacterium nucleatum* e *Prevotella intermedia* são caracteristicamente associados com este aspecto clínico, embora com significância estatística apenas entre a presença de abscesso submucoso e *Peptostreptococcus prevotii* ( $p < 0,05$ ), e entre abscesso submucoso localizado e *Peptostreptococcus anaerobius* ( $p < 0,05$ ). Em acordo GOMES (2002) investigou a microbiota de 100 canais radiculares infectados, sendo que abscessos periapicais estavam presentes em 44 casos e apresentaram significativamente associados com a presença de anaeróbios tais como *Peptostreptococcus micros*, *P. prevotii* ( $p < 0,01$ ).

Autores como BAUMGARTNER *et al.* (1996), SOUSA (2000), SIQUEIRA *et al.* (2001a,b), também encontraram os mesmos microrganismos, apesar de não estarem estatisticamente relacionados com a presença de abscessos.

Outras associações observadas foram entre a presença de edema e *Peptostreptococcus* spp., *Gemella* spp. e *Gemella morbillorum* ( $p < 0,05$  para todos). 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. Este resultado está de acordo com trabalho de GOMES *et al.* (1994a, 1996a) que encontraram associações estatisticamente significantes entre edema e a presença de *Prevotella* spp., *Peptostreptococcus micros* e *Eubacterium* spp.. Também com o trabalho de GOMES (2002) que observou edema do tecido periodontal ao redor dos dentes examinados microbiologicamente em 27/100 casos e estava associado com a presença de *Peptostreptococcus* spp. (principalmente *P. anaerobius* e *P. prevotii*, ambos  $p < 0,05$ ), *Fusobacterium* spp. (especialmente *F. necrophorum*), *Actinomyces* spp. e *Enterococcus* spp.. (particularmente *E. faecalis*) (todos  $p < 0,05$ ).

Também foi observada correlação positiva entre a presença de exsudato purulento no canal radicular com a espécie *Peptostreptococcus prevotii* ( $p < 0,05$ ). No trabalho de HASHIOKA *et al.* (1992) observaram correlação positiva das bactérias *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium lentum*, *Porphyromonas gingivalis*, *P. endodontalis*, *Bacteroides* spp. e canais radiculares com exsudato purulento independente da presença de dor espontânea ou provocada. Já SOUSA *et al.*, (2000) investigando 20 canais radiculares com exsudato purulento, não obtiveram correlação estatisticamente significativa entre qualquer espécie encontrada e exsudato purulento. GOMES (2002) analisando a microbiota de 100 canais radiculares infectados. Observou que em 45 canais continham exsudato. *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* e *Streptococcus* spp. predominaram nos 27 casos de canais com exsudato purulento ( $p < 0,05$ ).

Dessa forma, pode-se afirmar que é necessária uma interação microbiana para que exista a doença. Porém, a mera presença de bactérias em um tecido (infecção) não implica no desenvolvimento da doença, esta dependerá da inter-relação do número de células bacterianas, virulência das cepas, duração da agressão e resistência do hospedeiro (GOMES 1995).

Neste estudo (n=60), foi encontrado em 58,3% dos casos examinados (35 canais radiculares) a presença de *Peptostreptococcus* spp., e em 45% (27 canais radiculares) de *Fusobacterium* spp.. Estes resultados estão de acordo com o trabalho de ADERHOLD *et al.* (1981) que estudando a microbiota de 50 abscessos periapicais agudos, encontraram em 66% (33) dos casos, cocos anaeróbios Gram-positivos entre eles *P. anaerobius*, *P. prevotii*, *P. magnus* e *P. asaccharolyticus* e, LABRIOLA *et al.* (1983) encontraram 277 microrganismos diferentes de 50 abscessos orofaciais, destes 22 eram cocos anaeróbios Gram-positivos (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus productus*, *Peptostreptococcus magnus* e *Peptostreptococcus asaccharolyticus*), embora estes estudos sejam de amostras obtidas por aspiração do abscesso periapical.

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

Fatores de virulência de *Peptostreptococcus micros* incluem atividade enzimática proteolítica, elaboração de hialuronidase, produção de componentes sulfúricos voláteis de L-cisteína e inibição de fibroblastos gengivais humanos e crescimento de célula epitelial (GOMES, 1995). VAN DALEN *et al.* (1998) observaram que a espécie de *P. micros* desenvolveu atividade sinérgica sobre a virulência dos microrganismos *Prevotella nigrescens* e principalmente *P. intermedia*.

*Fusobacterium* spp., em particular, a espécie *Fusobacterium nucleatum*, têm também sido relatada ser capaz de produzir abscessos experimentais (BROOK & WALKER, 1986), alguns dos quais foram associados com reações severas (LEWIS *et al.* 1988). BROOK & WALKER (1986) relataram que a capacidade da espécie de

*Fusobacterium* induzir abscessos subcutâneos pode ser correlacionada com a presença de uma fina camada mucopolissacarídica na parede celular, podendo ser uma indicação de virulência do microrganismo como tem sido reportado para outras espécies anaeróbias (KASPER, 1976).

As bactérias anaeróbias estritas mais freqüentemente isoladas foram *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia/nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus constellatus* e, dentre as anaeróbias facultativas, *Gemella morbillorum*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguis*. Os resultados deste estudo estão em concordância com os resultados de OGUNTEBI *et al.* (1982) que examinando abscessos periapicais agudos, encontraram mais freqüentemente as espécies *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mitis*. SABISTON & GOLD (1974) verificaram que *Fusobacterium nucleatum* foi a espécie com maior ocorrência, estando presente em 7 de 8 abscessos investigados e sendo a maior espécie constituinte da infecção em 5 dos 8 casos. Em estudo similar, SABISTON *et al.* (1976), de um total de 65 casos de abscessos dentais, relataram que 69% das espécies isoladas foram bastonetes anaeróbios Gram-negativos (24% sendo *Fusobacterium nucleatum*) e 48,3% cocos anaeróbios Gram-positivos (22,4% sendo *Peptostreptococcus micros*, 15,5% *P. anaerobius* e 3,4% *P. magnus*).

Resultado semelhante foi encontrado por WILLIAMS *et al.* (1983) que investigando 10 casos com abscessos agudos observaram a maior freqüência das espécies *Fusobacterium nucleatum* em 60% dos casos e em 14,8% dos isolados, *Peptostreptococcus micros* em 50% dos casos e em 17,7 % dos isolados e *P. anaerobius* em 10% dos casos e em 2,7% dos isolados. HEIMDAHL *et al.* (1985) relataram que *Fusobacterium nucleatum* foi freqüentemente associada com infecções odontogênicas agudas.

Outras espécies de *Peptostreptococcus* foram encontradas tais como, *P. anaerobius* em 6,6% dos casos, *P. magnus*, *P. tetradius* e *P. asaccharolyticus*, todas em 3,3%. Embora a literatura destaque mais a presença da espécie *Peptostreptococcus micros*

nas análises microbiológicas de abscessos periapicais, os resultados do presente trabalho mostram maior prevalência da espécie bacteriana *Peptostreptococcus prevotii* em 36,7% dos casos investigados (22 canais radiculares).

A espécie bacteriana *Gemella morbillorum* foi encontrada em 31,7% dos casos (19 canais radiculares), similar a WASFY *et al.* (1992) que encontraram este isolado como um dos mais freqüentes, em 47,4% dos casos analisados. Estes autores agruparam esta espécie com as anaeróbias estritas, similar aos estudos de KANTZ & HENRY (1974) e SABISTON *et al.* (1976), embora estes últimos citem que *Gemella morbillorum* é uma espécie aerotolerante, como classificada por MORSE (1987); SUNDQVIST *et al.* (1992b); GOMES (1995) e também no presente estudo.

O gênero *Streptococcus* tem sido reportado como um dos grupos de microrganismos mais encontrados em canais radiculares infectados, sendo o *Streptococcus mitis* um dos microrganismos mais comuns do grupo (SUNDQVIST, 1992a). No presente estudo este microrganismo foi encontrado em 13 de 60 canais radiculares, tornando-o o microrganismo mais prevalente do grupo. Também em marcante presença o *Streptococcus sanguis* em 11 de 60 canais radiculares. Em estudos anteriores (SABISTON *et al.*, 1976; OGUNTEBI *et al.*, 1982; WILLIANS *et al.*, 1983), as espécies *S. mitis* e *S. sanguis* foram encontradas predominantemente em casos de abscessos endodônticos. WASFY *et al.* (1992) encontraram *S. mitis* em 7 de 78 canais radiculares (8,9%), sendo que este trabalho foi realizado através de amostras de canais radiculares pelo método de cultura como no presente estudo. SIQUEIRA *et al.* (2002) investigando a presença de espécies de *Streptococcus*, *Actinomyces* e *Enterococcus* em canais radiculares infectados através do método de hibridização de DNA-DNA, obtiveram a identificação de 33,3% (9/27) de *Streptococcus* spp., sendo que não observaram a presença do *Streptococcus mitis* (0/27) nos casos de abscessos periapicais e somente 7,4% (2/27) da espécie *Streptococcus sanguis*.

*Streptococcus sanguis*, segundo DRUCKER *et al.* (1992) tem sido associado com endocardite infecciosa, que é fatal em 10% dos casos. Algumas espécies de

*Streptococcus milleri*, que é moderadamente cariogênico, têm sido associadas com abscessos cerebrais e do fígado. Apesar de muitos microrganismos não estarem associados com determinados sinais e sintomas de origem endodôntica, seu potencial de envolvimento nas infecções sistêmicas não deve ser esquecido.

*Streptococcus constellatus* foi também uma das espécies bacterianas mais encontradas neste estudo, presente em 12 dos 60 canais radiculares investigados (20%). Outros autores (SABISTON *et al.*, 1976; KULEKÇI *et al.*, 1996; GOMES *et al.*, 1996a,b) também encontraram esta espécie, embora em menor prevalência. Em acordo com o presente trabalho SIQUEIRA *et al.* (2001c) avaliando 27 amostras de abscessos periapicais agudos através do método de hibridização de DNA-DNA, observaram a presença de *Streptococcus constellatus* em 25,9% (7/20 canais radiculares) sendo uma das espécies mais prevalentes.

Outras espécies de *Streptococcus* foram encontradas no presente estudo, tais como *S. oralis* (6/60), *S. anginosus* (3/60), *S. acidominus* (2/60), e *S. intermedius*, *S. salivarius* e *S. mutans* todas (1/60), totalizando 50 de 287 microrganismos do gênero *Streptococcus* presentes em 37 dos 60 canais radiculares examinados (61,6%) mostrando a grande incidência e diversidade de espécies presentes nos canais radiculares com abscessos periapicais.

Autores sugeriram que os *Streptococcus* spp. podem ser importantes nas fases iniciais da formação do abscesso, preparando o ambiente para subsequente invasão anaeróbia, agindo sinergicamente com as bactérias anaeróbias (ADERHOLD *et al.*, 1981; LEWIS *et al.*, 1986a; LEWIS *et al.*, 1988).

Outro gênero muito encontrado foi a *Prevotella*, presente em 21/60 canais radiculares sendo não pigmentadas a *Prevotella buccae* em 5/60 canais radiculares, *P. oralis* e *P. oris* em 2/60 e *P. bivia* em 1/60. Também foram observadas as bactérias pigmentadas de negro como a *Prevotella intermedia/nigrescens* em 16/60 canais radiculares, *Prevotella*

*corporis* (6/60), *Prevotella loescheii* (3/60), *Prevotella melaninogenica* (3/60). *Porphyromonas* spp. foi encontrada em menor frequência sendo *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas asaccharolytica* ambas em 1/60 canais radiculares. GOMES *et al.* (1995) compararam a inoculação direta sobre meio sólido das amostras bacterianas de *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas gingivalis* através de pontas de papel absorvente, com a inoculação das pontas no meio de transporte (RTF) e observaram que o primeiro método (colocação direta das pontas de papel em meio sólido) permitiu recuperar maior número desses microrganismos. No presente estudo, como já citado, foi utilizado também o meio de transporte RTF podendo então sugerir que este não influencia a recuperação de bactérias pigmentadas de negro.

OLIVEIRA *et al.* (2000) com o propósito de identificar *P. endodontalis* em 44 canais radiculares com polpas necrosadas através do método de PCR observaram que a *P. endodontalis* foi detectada em 39,5% dos casos (17/43 casos) e estava presente em 4 de 6 casos com abscesso periapical agudo (66,7%). Os autores afirmam que a alta prevalência de *P. endodontalis* em abscessos perirradiculares agudos sugere que esta bactéria tem potencial para ser um importante patógeno endodôntico. Estes resultados contrastam com o presente estudo, pois não foi possível a recuperação deste microrganismo através do método utilizado, o método de cultura. KHERNALEELAKUL *et al.* 2002 também não conseguiram recuperar *Porphyromonas endodontalis* de coletas aspiradas de abscessos endodônticos agudos. Resultados de trabalhos que utilizaram o método de cultura revelaram a presença de *P. endodontalis* em canais radiculares infectados entre 0% a 7% (HAAPASALO *et al.*, 1986; SUNDQVIST *et al.*, 1989; DOUGHERTY *et al.*, 1998; BAUMGARTNER *et al.*, 1999).

Devido a *P. endodontalis* ser altamente sensível ao oxigênio, OLIVEIRA *et al.*, 2000 afirmam que esta pode ser uma razão pela qual a espécie não é facilmente detectada pelo método de cultura. Seria então, uma sugestão correlacionar o resultado do presente estudo com método molecular para a detecção de *P. endodontalis*. Entretanto, SIQUEIRA *et al.* (2001c) avaliando a microbiota de abscessos perirradiculares agudos pelo método de

hibridização de DNA-DNA observaram a presença de *P. endodontalis* em apenas 4 dos 27 casos investigados. Além do mais, DYRNOCK *et al.* 1996 e BAUMGARTNER *et al.* 2002 mencionaram que diferentes populações têm correspondentemente diferentes composições de microbiota, ainda afirmam que talvez espécies de *Porphyromonas* podem consistir em cepas cultiváveis e não-cultiváveis.

GOMES *et al.* (1995) afirmam que é necessário o mínimo de concentração desses microrganismos para o seu isolamento com a técnica de cultura, e por consequência, para o seu reconhecimento na situação clínica. GOMES (1995) pressupõe que se *Porphyromonas* spp. estão presentes em baixa concentração, será difícil detectar sua presença pelo uso de métodos de cultura.

Assim, a bactéria pigmentada mais encontrada no presente trabalho foi *Prevotella intermedia/nigrescens* em 16/60 canais radiculares. *Prevotella intermedia* tende a estar mais associada com doenças periodontais enquanto que *P. nigrescens* (fenotipicamente similar a *P. intermedia*) com locais saudáveis da cavidade oral. Entretanto, ambas têm sido isoladas tanto de dentes sintomáticos como assintomáticos (HAAPASALO *et al.*, 1986; PANTERA *et al.*, 1988). Estudos têm sugerido que *P. nigrescens* é o bacilo produtor de pigmento negro mais freqüentemente encontrado nas infecções endodônticas (GHARBIA *et al.*, 1994; BAE *et al.*, 1997; DOUGHERY *et al.*, 1998; BAUMGARTNER *et al.*, 1999).

Devido não constar nas bases de dados dos "kits" de identificação bacteriana adotados para o presente estudo a identificação para a espécie *Prevotella nigrescens*, esta foi identificada com a nomenclatura *Prevotella intermedia/nigrescens*, sendo que até o momento a espécie *Prevotella nigrescens* é somente identificada através de métodos não-bioquímicos (por exemplo PCR).

Estes resultados estão em desacordo com os trabalhos de WASFY *et al.* (1992) que identificaram bactérias pigmentadas de negro em 56,5% das coletas de canais

radiculares infectados, dos quais 39,7% eram *Prevotella intermedia*, embora esta espécie tenha sido uma das mais freqüentemente encontradas no presente estudo com 26,7%. Entretanto, nos estudos de OGUNTEBI *et al.* (1982); WILLIANS *et al.* (1983); LABRIOLA *et al.* (1983) as bactérias pigmentadas de negro foram encontradas em menor frequência estando compatível com os resultados deste estudo. VAN WINKELHOFF *et al.* (1985) admitem a dificuldade em recuperar estas espécies bacterianas. GOMES (2002) encontraram bacilos produtores de pigmento negro em 24/100 canais radiculares infectados, sendo que destes 22 estavam com polpa necrosada. Corresponderam às espécies *Porphyromonas gingivalis* (4/24), *Porphyromonas endodontalis* (3/24), *Prevotella intermedia/nigrescens* (11/24), *Prevotella corporis* (8/24), *Prevotella loescheii* (4/24), *Prevotella denticola* (1/24) e *Prevotella melaninogenica* (1/24).

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

As bactérias pigmentadas de negro, neste trabalho, não foram nunca isoladas como únicas espécies nos canais investigados, estando sempre em combinação com outras bactérias, principalmente com as Gram-positivas, confirmando a existência de sinergismo bacteriano, que seria um fator determinante do potencial patogênico destas espécies (BAUMGARTNER *et al.*, 1992; GOMES *et al.*, 1994a; GOMES 2002). Além disso, a presença de outras espécies parece ser necessária para diminuir a tensão de óxido-redução nos canais radiculares a um nível adequado para o crescimento de *Porphyromonas* spp. e *Prevotella* spp., e sem estes microrganismos, as bactérias pigmentadas de negro não conseguiriam sobreviver (GOMES *et al.*, 1994a). Estas bactérias têm necessidades nutricionais específicas que são fornecidas por determinados microrganismos, como a

hemina que é liberada por *Veillonella* spp. por exemplo. Já a necessidade de vitamina K é fornecida por *Campylobacter* spp., e succinato fornecido por *Fusobacterium* spp., *Eubacterium*, spp., *Peptostreptococcus* spp., *Capnocytophaga* spp., *Eikenella corrodens*, *Streptococcus* spp, *Actinomyces* spp., e podem favorecer como subprodutos metabólicos (SUNDQVIST, 1994).

*Prevotella* e *Porphyromonas* encontradas nas infecções dos canais radiculares produzem várias enzimas que contribuem para sua patogenicidade. Muitas destas enzimas estão envolvidas na reabsorção óssea e destruição tecidual. De interesse especial são as enzimas capazes de degradar ou inativar proteínas plasmáticas humanas envolvidas na defesa do hospedeiro. Imunoglobulinas e fatores de complemento, assim como inibidores de proteínas plasmáticas do coágulo, sistema fibrinolítico e de cininas exercem um papel importante nas várias fases da defesa do hospedeiro contra a invasão de microrganismos. Muitas destas proteínas plasmáticas são degradadas ou inativadas pelas espécies produtoras de pigmento negro dentro do gênero *Porphyromonas* e *Prevotella* (SUNDQVIST, 1994). A capacidade de *P. endodontalis*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *P. loescheii* de degradar imunoglobulinas e fator C3 do sistema de complemento é relevante, pois pode prejudicar o processo de fagocitose, no qual imunoglobulinas e o fator C3 são importantes opsoninas (CARLSSON *et al.*, 1984a; CARLSSON *et al.*, 1984b; SUNDQVIST *et al.*, 1984; SUNDQVIST *et al.*, 1985; SUNDQVIST, 1994).

Pode-se observar no presente estudo também, embora em pequena amostra, a presença de espécies de *Enterococcus*, estando o *Enterococcus faecalis* presente em 3 de 56 canais radiculares necrosados (infecção primária) e em 1 de 4 canais radiculares com tratamento endodôntico prévio. O *Enterococcus faecium* esteve presente em 1 canal radicular necrosado. O *Enterococcus faecalis*, (cocos Gram-positivo anaeróbio facultativo) é um microrganismo adaptado a ambientes ecologicamente complexos da cavidade oral, trato gastrointestinal e vaginal. Embora tenha sido ocasionalmente detectado em canais radiculares infectados (infecção primária), estudos têm revelado que este microrganismo pode ser encontrado em infecções persistentes (MÖLLER, 1966; SUNDQVIST *et al.*,

1998). Baseado em diversos estudos (NAIR *et al.*, 1990a,b; MOLANDER *et al.*, 1998; SUNDQVIST *et al.*, 1998; PECIULIENE *et al.*, 2000; PINHEIRO, 2000; PECIULIENE *et al.*, 2001; GOMES 2002) que comprovam que esses microrganismos podem ser a causa da persistência de infecções endodônticas, a investigação de sua presença em infecções primárias assume especial importância. SIQUEIRA *et al.* (2002) investigaram a prevalência do *Enterococcus faecalis* em canais radiculares com infecção primária e verificaram a presença deste microrganismo em 3 casos assintomáticos e em 1 caso com abscesso periapical agudo. Resultado este, compatível com o presente estudo, mostrando a pequena quantidade de *Enterococcus faecalis* em canais radiculares com infecções primárias, porém presente. Além do mais, a ocorrência de *E. faecalis* pode teoricamente, colocar em risco o resultado da terapia endodôntica. Dessa forma, outra sugestão seria uma investigação para delinear a participação desses microrganismos nas infecções endodônticas primárias.

Em 60 canais radiculares infectados associados a abscessos periapicais analisados, um apresentou cultura negativa e, dos 59 canais radiculares restantes, foi isolado de 1 a 14 espécies bacterianas. Na suposição de que a microbiota de dentes associados a abscessos periapicais deva conter uma quantidade mínima de espécies necessárias para produzir doença, a média de espécies bacterianas encontrada por canal radicular neste estudo foi 4,8. Este resultado é compatível com outros estudos que relataram valores entre 2,5 e 6,0 (SABISTON *et al.*, 1976; SUNDQVIST, 1976; ADERHOLD *et al.*, 1981; BROOK *et al.*, 1981; OGUNTEBI *et al.*, 1982; WILLIAMS *et al.*, 1983; YOSHIDA *et al.*, 1987; WASFY *et al.*, 1992; BAUMGARTNER *et al.*, 1999; VAFAIE *et al.*, 1999; JUNG *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2000; SIQUEIRA *et al.*, 2001b; GOMES 2002).

Embora em pequena amostra, no presente estudo, 3 casos ocorreram presença de abscesso periapical em dentes com coroa hígida, sem evidência de cárie ou doença periodontal e, com necrose pulpar determinada através de testes de sensibilidade térmica. As bactérias encontradas foram *P. prevotii*, *F. necrophorum* *S. constellatus* e *P. micros* em um dos casos, no outro *P. prevotii*, *F. necrophorum* *S. constellatus*, *P. anaerobius* e *Gemella morbillorum*, e no terceiro caso a presença de *Prevotella intermedia*,

*Streptococcus mitis*, *Gemella morbillorum* e *Cardiobacterium hominis* caracterizando presença de microbiota mista anaeróbia. De acordo com CSERNYEI (1939) a contaminação pulpar pode ocorrer por via anacorética, pois bactérias presentes na corrente sanguínea têm a capacidade de localizar e colonizar áreas de polpa inflamada de dentes traumatizados, mesmo não havendo exposição pulpar à cavidade oral. Se a resistência do hospedeiro não for suficientemente competente para erradicá-las, estas bactérias e seus produtos tóxicos persistem e induzem um processo inflamatório destrutivo. Dessa forma, essa via de contaminação poderia explicar a infecção pulpar em dentes traumatizados portadores de coroa dental hígida. Outra hipótese é a ocorrência de trincas de esmalte e fissuras em dentes traumatizados, por onde as bactérias podem invadir os túbulos dentinários expostos, os quais não oferecem maior resistência, uma vez que o seu conteúdo encontra-se necrosado e sem função, como resultado da necrose pulpar advinda do trauma (WITTIGOW & SABISTON, 1975; SUNDQVIST, 1976).

As diferenças na frequência de isolamento microbiano de um estudo para outro se dá provavelmente devido a um grande número de variáveis que incluem a técnica de coleta de amostras; o meio de transporte utilizado; o meio de cultura e os métodos de incubação e identificação. Podendo ser também devido as diferentes quantidades de amostras investigadas em cada estudo e/ou estágio da infecção. Ainda, BAUMGARTNER *et al.* 2002 mencionaram que diferentes populações podem apresentar diferentes microbiotas.

A lista de microrganismos identificados está na TAB. 4, sendo compatível com os encontrados na literatura consultada. Portanto, os resultados sugerem que a técnica de coleta bacteriana empregada com isolamento absoluto do dente e desinfecção com hipoclorito de sódio foram efetivos no controle de contaminantes no campo operatório.

Este trabalho mostrou que anaeróbios estritos e os estreptococos são importantes componentes da microbiota de canais radiculares infectados. Também indicou que anaeróbios específicos estão relacionados com os sinais e sintomas de origem endodôntica.

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

## **6.2. Análise da suscetibilidade antimicrobiana**

A seleção de métodos para teste de suscetibilidade de anaeróbios estritos tem apresentado grandes dificuldades. Métodos desenvolvidos para microrganismos de crescimento rápido, como aeróbios, tentaram ser adaptados as necessidades dos anaeróbios estritos, mas mostraram problemas na padronização e não conseguiram reproduzir resultados fiéis (WEXLER, 1993).

Segundo DUERDEN (1995) essas dificuldades são geradas por várias razões dentre elas é o fato de que os anaeróbios estritos tendem a crescer mais lentamente que muitos aeróbios e seguem o mesmo caminho os anaeróbios facultativos; também o equilíbrio entre o efeito do antimicrobiano, crescimento bacteriano, e a degradação do antibiótico podem variar muito mais para os anaeróbios estritos. Essas características afetam principalmente os resultados dos testes de suscetibilidade com disco. Muitos anaeróbios estritos necessitam de meios mais enriquecidos (vitamina K e hemina), que aqueles usados para os testes de aeróbios. Os meios de cultura são mais difíceis de serem padronizados, e podem ocorrer interações entre os componentes do meio, por exemplo o sangue e o antibiótico. A presença da fermentação de meios enriquecidos pode levar a uma significativa queda no pH do meio durante a incubação e, conseqüentemente, alterar os resultados dos antibióticos sensíveis à alteração de pH. Muitos anaeróbios necessitam de CO<sub>2</sub> e, por isso, todas as misturas padrões de gás para anaeróbios contêm CO<sub>2</sub>, fazendo com que haja mais redução do pH do meio. Outra razão é que alguns anaeróbios estritos não crescem adequadamente em pequenas concentrações nos inóculos (padrões recomendados para testes de suscetibilidade) assim, o crescimento dessas espécies bacterianas pode ser inadequado, dificultando a obtenção dos resultados.

Testes de suscetibilidade com discos não são recomendados pela NCCLS para anaeróbios de crescimento lento. Os métodos recomendados são baseados em diluição em ágar, microdiluição em caldo ou macrodiluição. Alguns desses métodos não têm sido inteiramente satisfatórios e não são apropriados para testes de isolados clínicos individuais.

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

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

O meio de cultura escolhido para o teste de suscetibilidade (*E-test*) foi o Brucella ágar adicionado de 5% de sangue desfibrinado de carneiro, suplementado com vitamina K e menadiona para melhores condições de crescimento das bactérias anaeróbias estritas, produzindo CIMs consistentes e compatíveis com a literatura. CITRON *et al.* (1991) observaram menores discrepâncias nas CIMs dos antibióticos testados quando utilizaram o Brucella ágar como meio de cultura para as bactérias, quando compararam com o “Wilkens-Chalgren” ágar. Resultados similares foram encontrados por COUROUX *et al.* (1993), com a preferência para Brucella ágar suplementado. BOLMSTRÖM (1993) também utilizou Brucella ágar suplementado com vitamina K e menadiona e observou bom crescimento bacteriano e resultados consistentes de CIMs.

Quanto ao tempo de incubação para o teste de suscetibilidade, como regra geral, um período de 24 horas de incubação não é suficiente para obter um resultado do *E-test* possível de ser interpretado, quando se trata de espécies anaeróbias estritas. Em 1992, WUST & HARDEGGER observaram resultados mais definidos na leitura após 44 horas quando comparado com a leitura de 20 horas. No estudo de ROSENBLATT & GUSTAFSON (1995) os autores reportaram que 64% das espécies anaeróbias testadas pelo *E-test* puderam ser interpretadas após 24 horas de incubação. Entretanto, 95% dos mesmos testes puderam ser interpretados após 48 horas de incubação, semelhante ao que ocorreu no presente estudo, sugerindo assim que a melhor opção é a incubação de 48 horas obtendo-se assim, uma leitura dos resultados mais definida. Além do mais, BOLMSTRÖM, 1993 afirma que a CIM da clindamicina deve ser confirmada com 48 horas de incubação para a obtenção de um resultado confiável.

As concentrações inibitórias mínimas determinadas pela NCCLS têm sido usadas em vários estudos bacteriológicos (NACHNANI *et al.*, 1992; VAN-STEENBERGEN *et al.*, 1993; ROSENBLATT & GUSTAFSON, 1995; CONTI *et al.*, 1999; POULET *et al.* 1999a,b; KURIYAMA *et al.*, 2000; KURIYAMA *et al.*, 2001). Entretanto, as CIMs determinadas pela NCCLS podem ser muito rigorosas para alguns antibióticos, uma vez que estão abaixo da concentração do antibiótico nos tecidos. Além disso, espécies resistentes a específico 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).

As espécies de *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* foram testadas contra os antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina combinada com ácido clavulânico, metronidazol, cefaclor, clindamicina, azitromicina e eritromicina. As espécies de *Peptostreptococcus prevotii* mostraram suscetibilidade em 83,3% ao antibiótico metronidazol, *Fusobacterium necrophorum* revelaram suscetibilidade em 90,9% sendo que

as espécies *Peptostreptococcus micros* e *Prevotella intermedia* mostraram-se sensíveis em 100% a este antibiótico.

Autores observaram que nos testes de suscetibilidade com o metronidazol, a incompleta anaerobiose pode levar a um resultado falso resistente para microrganismos anaeróbios (BRAZIER *et al.*, 1992; PALMER *et al.*, 1994). POULET *et al.* (1999a) avaliaram a suscetibilidade de microrganismos anaeróbios contra metronidazol e observaram a excelente atividade desta droga contra *P. intermedia*, *P. gingivalis* e *Fusobacterium* spp.. Também em 1999b POULET *et al.* demonstraram uma ótima atividade do metronidazol contra *P. intermedia*, sendo suscetíveis em 100% das espécies. BOLMSTRÖM, 1993 relata que a anaerobiose é rapidamente encontrada dentro das primeiras poucas horas, e que o resultado de falsa-resistência poderia ser evitado se o metronidazol for utilizado com placas pré-reduzidas. Assim foi realizado o presente estudo, utilizando placas pré-reduzidas em todo o experimento.

Embora as CIMs da azitromicina e eritromicina para as bactérias anaeróbias estritas não foram ainda determinadas pela NCCLS foi observado que as espécies de *Peptostreptococcus prevotii* revelaram suscetibilidade em 83,3% aos antibióticos azitromicina e eritromicina. *Fusobacterium necrophorum* mostraram a suscetibilidade em 90,9% ao antibiótico azitromicina e ainda em 63,3% de suscetibilidade a eritromicina. *Fusobacterium nucleatum* revelaram sensibilidade em 90% ao azitromicina e somente em 10% a eritromicina. *Peptostreptococcus micros* e *Prevotella intermedia* mostraram-se sensíveis em 100% aos antibióticos azitromicina e eritromicina.

Para os demais antibióticos (benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato de potássio, cefaclor, clindamicina) testados no presente estudo todas as espécies mostraram-se sensíveis.

Esses resultados coincidem com os achados de YAMAMOTO *et al.* (1989) que verificaram alta sensibilidade de 60 espécies de *Peptostreptococcus* isoladas de canais

radiculares com periodontites apicais agudas, quando testadas contra as drogas penicilina, tetraciclina, eritromicina e gentamicina, afirmando que as penicilinas são as drogas indicadas, quando necessárias, como suporte ao tratamento de canais radiculares com periodontite periapical aguda. Porém, HUNT & MEYER (1983) detectaram o aparecimento de resistência entre espécies de *Peptostreptococcus*, verificando que aproximadamente 15% das espécies isoladas eram resistentes à penicilina e ampicilina, contradizendo o estudo de HUNT *et al.* (1978) no qual observaram, que as espécies de *Peptostreptococcus* não apresentaram resistência aos antibióticos testados (ampicilina, cefalotina e penicilina). Também observaram que em 31 espécies testadas, 16 mostraram resistência a eritromicina. Esta variação de resultados pode ser devido à época diferente desenvolvida pelos estudos sugerindo assim a necessidade de monitoramento constante da suscetibilidade microbiana, principalmente com o aparecimento de espécies resistentes.

Outros trabalhos como de APPELBAUM *et al.* (1990a); CITRON *et al.* (1991); APPELBAUM *et al.* (1992); CULLMANN *et al.* (1993); DAHLÉN *et al.* (1993); KURIYAMA *et al.* (2000) estão de acordo com os resultados do presente estudo.

Eritromicina e clindamicina têm sido prescritas para pacientes alérgicos à penicilina. Contudo, tem-se observado que a eritromicina não é efetiva contra *Fusobacterium* spp. (KURIYAMA *et al.*, 2000, 2001), estando de acordo com o presente estudo onde *Fusobacterium nucleatum* mostrou suscetibilidade em 10% das espécies contra a eritromicina e *Fusobacterium necrophorum* em 63,3%. Para a clindamicina o presente estudo verificou sensibilidade de todas as espécies testadas como verificado por KURIYAMA *et al.*, 2000, 2001.

Segundo WALKER (1992), a eritromicina tem sido ineficaz contra a maioria das bactérias Gram-negativas, devido sua incapacidade de penetrar no complexo membrana externa-parede celular. Enquanto que FASS (1993), afirma que a azitromicina tem boa ação contra as bactérias Gram-negativas, o que presumivelmente se deve a uma melhor

penetração da droga através da membrana externa e parede celular. Porém, segundo o autor, a azitromicina é menos ativa que a eritromicina contra bactérias Gram-positivas.

A diferença nos resultados dos vários estudos pode ser devido a diferentes épocas em que são realizadas as pesquisas, ou devido a diferentes áreas geográficas onde são realizados os testes, comprovando a necessidade de que estudos como estes devem ser realizados periodicamente.

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

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

Os abscessos periapicais foram classificados quanto à localização e o abscesso periapical submucoso foi o mais encontrado em 39 de 60 casos, sendo 31 difusos, sendo que nestes casos, em 14 houve a presença da espécie *Peptostreptococcus prevotii*, seguida de 11 casos com *Gemella morbillorum*, 10 com *P. micros* e *P. intermedia*, 9 casos com *Fusobacterium necrophorum*, e 7 casos com *F. nucleatum*. Enquanto que espécies de *Streptococcus* entre elas *S. sanguis* (8/20), *S. mitis* (7/20), *S. constellatus* (6/20) estavam presentes em 20 dos casos com abscesso submucoso difuso. Porém, na análise estatística observou-se que houve correlação positiva significativa entre o Abscesso submucoso (n=39) com a espécie *Peptostreptococcus prevotii* (n=22) (p<0,05). No presente estudo não foi possível realizar coletas microbiológicas de canais radiculares com abscessos periapicais

extra-orais pois estes são atendidos no centro cirúrgico com administração de antibioticoterapia, um dos critérios utilizados para a exclusão no presente trabalho. Também SOUSA (2000) encontrou 2 abscessos na fase intra-óssea, 5 na fase subperiosteal, 17 na fase submucosa, sendo 13 difusos e 4 localizados e 6 na fase de fistulização, 5 com fistula intra-oral e 1 extra-oral. Estes resultados sugerem a prevalência dos abscessos submucosos. A autora não encontrou nenhuma associação estatisticamente significativa entre a presença de abscessos periapicais com qualquer das espécies bacterianas estudadas. GOMES (2002) investigando 100 canais radiculares infectados, observaram abscessos periapicais presentes em 44 casos e apresentaram significativamente associados com a presença de anaeróbios tais como *Peptostreptococcus micros*, *P. prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* ( $p < 0,01$ ). Foram diagnosticados 5 abscessos na fase intra-óssea, 5 na fase subperiosteal, 22 na fase submucosa, sendo 18 difusos e 4 localizados e 12 na fase de fistulização, 11 com fistula intra-oral e 1 extra-oral. Também encontrou a prevalência dos abscessos submucosos.

Diante destes resultados as espécies bacterianas anaeróbias estritas *Peptostreptococcus prevotii*, *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* foram testadas através do *E-test* e apresentaram-se sensíveis aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulanato de potássio, e clindamicina. Dessa maneira pode-se sugerir, quando necessária a antibioticoterapia, a amoxicilina como a primeira escolha nos casos de abscessos periapicais, e para os pacientes alérgicos à penicilina, uma opção interessante seria a clindamicina.

DAILEY & MARTIN (2001) observaram que a maioria dos pacientes atendidos na emergência clínica dental com infecções localizadas como abscessos periapicais foram medicadas com a amoxicilina. Afirmam que os antibióticos devem ser usados como um auxiliar para os abscessos periapicais agudos e não como um tratamento.

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

HEIMDAHAL (2000) afirma que nas infecções graves, os agentes antimicrobianos são geralmente selecionados empiricamente, mas os principais fatores na escolha deles são: a) suscetibilidade antimicrobiana dos microrganismos mais freqüentemente envolvidos nas infecções odontogênicas, b) propriedades farmacológicas da droga e da melhor via de administração; c) efeitos colaterais dos agentes administrados. Resultados da coloração do Gram, produção de  $\beta$ -lactamase, métodos laboratoriais de identificação rápida e cultura irão, dentro de 48 horas na maioria dos casos, confirmar ou modificar a terapia empírica.

O desenvolvimento de infecções endodônticas está relacionado com interações microbianas. Porém, a defesa do hospedeiro, a natureza dos microrganismos, presença de agentes antimicrobianos ou inibidores, e outras pressões seletivas, dos quais ocorrem no ambiente endodôntico, também desempenham um importante papel na formação da infecção. Além do mais, a eficiente instrumentação e irrigação com agentes irrigantes apropriados, seguido de um selamento coronário eficiente deve ser capaz de impedir que a infecção se dissemine.

São necessárias novas pesquisas para o maior conhecimento do padrão de suscetibilidade das bactérias associadas a canais radiculares com abscessos periapicais, para um constante monitoramento desses microrganismos.

## 7 CONCLUSÕES

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

1- Canais radiculares de dentes associados a abscessos periapicais apresentaram microbiota mista com predominância de bactérias anaeróbias Gram-positivas;

2- A localização clínica mais freqüente dos abscessos periapicais estudados foi submucosa, na maioria dos casos encontrando-se difusa;

3- Houve correlação positiva entre o abscesso submucoso com a espécie *Peptostreptococcus prevotii* e entre abscesso submucoso localizado com a espécie *Peptostreptococcus anaerobius*;

4- Houve associações entre sinais e sintomas clínicos tais como edema e *Peptostreptococcus* sp., *Gemella* sp., e *Gemella morbillorum*, e a presença de exsudato purulento no canal radicular com *Peptostreptococcus prevotii*;

5- Os microrganismos testados apresentaram-se sensíveis aos antibióticos benzilpenicilina, amoxicilina, amoxicilina combinado com ácido clavulânico, metronidazol, clindamicina e cefaclor no *E-test*. *Peptostreptococcus prevotii* e espécies de *Fusobacterium* apresentaram resistência aos antibióticos azitromicina e eritromicina. Também se observou que *Peptostreptococcus prevotii* e *Fusobacterium necrophorum* mostraram resistência ao metronidazol.

6- Nenhum dos microrganismos testados produziu  $\beta$ -lactamase.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABOU-RASS, M.; BOGEN, G. Microorganisms in closed periapical lesions. *International Endodontic Journal*, 31: 39-47, 1998.

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

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

ALCOFORADO, G.A.P.; MCKAY, T.L.; SLOTS J. Rapid method for detection of lactose fermentation oral microorganisms. *Oral Microbiology and Immunology*, 2: 35-38, 1987.

AMATO-NETO, V.; LEVI, G.C.; LOPES, H.V.; MENDONÇA, J.S.; BALDY, J.L.S. *Antibióticos na prática médica*. 5.ed. São Paulo, Roca, 2000.

ANDRADE, E.D. *Terapêutica Medicamentosa em Odontologia*. São Paulo: Artes Médicas, 2000.

ANTRIM, D.D.; BAKLAND, L.K.; PARKER, M.W. Treatment of endodontic urgency care cases. *Dental Clinics of North America*, 30: 549-572, 1986.

APPELBAUM, P.C.; SPANGLER, S.K.; JACOBS, M.R.  $\beta$ -Lactamase production and susceptibilities to amoxicilin, amoxicilin-clavulanate, ticarcillin, ticarcillin-clavulanate, cefoxitin, imipenem, and metronidazole of 320 non-*Bacteroides fragilis* isolates and 129

Fusobacteria from 28 U.S. Centers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34: 1546-1550, 1990a.

APPELBAUM, P.C.; SPANGLER, S.K.; JACOBS, M.R. Evaluation of two methods for rapid testing for beta-lactamase production in *Bacteroides* and *Fusobacterium*. *European Journal of Clinical Microbiological and Infectious Diseases*, 1: 47-50, 1990b.

APPELBAUM P.C., SPANGLER S.K., SHIMAN R., JACOBS M.R. Susceptibilities of 540 anaerobic Gram-negative bacilli to amoxicillin, amoxicillin-BRL 42715, amoxicillin-clavulanate, temafloxacin, and clindamycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36: 1140-1143, 1992.

APPELBAUM PC, SPANGLER SK, COHEN M, JACOBS M. Comparison of the E-test and conventional agar dilution methods for susceptibility testing of Gram-negative anaerobic rods. *Diagnostic and Microbiology Infectious Disease*, 18: 25-30, 1994.

BAE, K.S.; BAUMGARTNER, J.C.; SHEARER, T.R.; DAVID, L.L. Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origins. *Journal of Endodontics*, 23: 620-623, 1997.

BAKER, K.A.; FOTOS, P.G. The management of odontogenic infections. A rationale for appropriate chemotherapy. *Dental Clinics of North America*, 38: 689-706, 1994.

BAKER, P.J.; EVANS, R.T.; SLOTS, J.; GENCO, R.J. Antibiotic susceptibility of anaerobic bacteria from the human oral cavity. *Journal of Dental Research*, 64, 1233-1244, 1985.

BARKER, G.R.; QUALTROUGH, A.J.E. An investigation into antibiotic prescribing at a dental teaching hospital. *British Dental Journal*, 162: 303-306, 1987.

BARNARD, D.; DAVIES, J.; FIGDOR, D. Susceptibilities of *Actinomyces israelii* to antibiotics, sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 29: 320-326, 1996.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45: 493-496, 1966.

BAUMGARTNER, J.C.; FALKLER, W.A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *Journal of Endodontics*, 17: 380-383, 1991.

BAUMGARTNER, J.C.; FALKLER, W.A.; BERNIE, R.S.; SUSUKI, J.B. Serum IgG reactive with oral microorganisms associated with infections of endodontic origin. *Oral Microbiology and Immunology*, 7: 106-110, 1992.

BAUMGARTNER, J.C.; WATKINS, B.J.; BAE, K.S.; XIA, T. Association of black-pigmented bacteria with endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 25, 413-415, 1999.

BAUMGARTNER, J.C.; WATTS, C.M.; XIA, T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*, 26: 695-8, 2000.

BAUMGARTNER, J.C.; SIQUEIRA, JF J.R.; XIA, T.; ROÇAS, I.N. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using PCR. *Journal Endodontics* 28: 238, 2002.

BERG, J.O.; NORD, C.E. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 81: 163-166, 1973.

BERGENHOLTZ, G.; CRAWFORD, J.J. Endodontic microbiology. In: Walton RE & Torabinejad M, eds. *Principles and practice of endodontics*. 1<sup>st</sup> edn. Philadelphia, PA, USA: WB Saunders Ca, 267-282, 1989.

BERGENHOLTZ, G. Inflammatory response of the dental pulp to bacterial irritation. *Journal of Endodontics*, 7: 100-104, 1981.

BERNAL, L.A.; GUILLOT, E.; PAQUET, C.; MOUTON, C.  $\beta$ -lactamase-producing strains in the species *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiology and Immunology*, 13: 36-40, 1998.

BOGEN, G.; SLOTS, J. Black-pigmented anaerobic rods in closed periapical lesions. *International Endodontic Journal*, 32: 204-210, 1999.

BOLMSTRÖM, A. Susceptibility testing of anaerobes with *E-test*. *Clinical and Infectious Disease* 16 (Suppl 4): S367-370, 1993.

BRAZIER, J.; HALL, V.; DUERDEN, B. Artefactual resistance to metronidazole in anaerobes of the *Bacteroides fragilis* group. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 30: 553-554, 1992.

BRICELAND, L.L.; PASKO, M.T.; MYLOTTE, J.M. Serum bactericidal rate as a measure of antibiotic interactions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 31: 679-685, 1987.

BRISSON-NOEL, A.; TRIEU-CUOLT, P.; COURVALIS, P. Mechanism of action of spiramycin and other macrolides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 22 (SupplB):13-23, 1988.

BROOK, I.; WALKER, R.I. The relation between *Fusobacterium* species and other flora of mixed infection. *Journal of Medical Microbiology*, 21: 93-100, 1986.

BROOK, I.; GRIMM, S.; KIELICH, R.B. Bacteriology of acute periapical abscess in children. *Journal of Endodontics*, 7: 378-380, 1981.

BROOK, I. Effect of *Streptococcus faecalis* on the growth of *Bacteroides* species and anaerobic cocci in mixed infection. *Surgery*, 103: 107-110, 1988.

BROWN, D.F. The *E-test* challenged with select strains. *Diagnostic and Microbiology Infectious Disease*, 15: 465-468, 1992.

BUSH, K.  $\beta$ -lactamase inhibitors from laboratory to clinic. *Clinical Microbiology Reviews*, 1:109-123, 1988.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS A.A. A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamase and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233, 1995.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriological evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 55: 307-312, 1983.

CARLSSON, J.; HÖFLING, J.F.; SUNDQVIST, G.K. Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin, by black-pigmented *Bacteroides* species. *Journal of Medical Microbiology*, 18: 39-46, 1984.

CARLSSON, J.; HERRMANN, B.F.; HÖFLING, J.F.; SUNDQVIST, G.K. Degradation of the human proteinase inhibitors alpha-1-antitrypsin and alpha-2-macroglobulin by *Bacteroides gingivalis*. *Infection and Immunity*, 43: 644-648, 1984.

CHAMBERS, H.F.; SANDE, M.A. Antimicrobial agents. *In: Hardman JG, Gilman AG, Limbird LE Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics.* 9<sup>th</sup> edn. U.S., 1032-1141, 1996.

CITRON, D.M.; OSTAVARI, M.I.; KARLSSON, A.; GOLDSTEIN, E.J.C. Evaluation of the *E-test* for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Journal of Clinical Microbiology* 2197-2203, 1991.

COHEN, S. & BURNS, R.C. *Pathways of the pulp.* 7th edn. St. Louis, Mosby, USA: C.V. Mosby Co., 1998.

CONRADS, G.; GHARBIA, S.E.; GULABIVALA, K.; LAMPERT, F.; SHAH, H.N. The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria. *Journal of Endodontics*, 23: 433-8, 1997.

CONSOLARO, A.; RIBEIRO, F.C. Periapicopatias: Etiopatogenia e inter-relações dos aspectos clínicos, radiográficos e microscópicos e suas implicações terapêuticas. *In: Leonardo M.R. & Leal J.M. Endodontia-Tratamento de canais radiculares.* 3<sup>a</sup> ed. São Paulo, Panamericana, 1998.

CONTI, R.; ZELANTE, F.; PIGNATARI, A.C.C.; MAYER, M.P.A. Phenotypic identification and antimicrobial susceptibility of black-pigmented bacteria. *Anaerobe*, 5: 455-459, 1999.

COOLIDGE, E.D. The diagnosis and treatment of conditions resulting from dental pulps. *Journal of the National Dental Association*, 6, 377-349, 1919.

COUROUX, P.R.; MASSEY, V.E.; SCHIEVEN, B.C.; LANNIGAN, R.; HUSSAIN, Z. Comparison of the *E-test* and reference agar dilution method for susceptibility of gram-

negative anaerobic organisms. *American Journal of Clinical Pathology*, 100: 301-303, 1993.

CSEERNYEI, J. Anacoretic effect of chronic periapical inflammations. *Journal of Dental Research*, 18: 527-531, 1939.

CULMANN, W.; FREI, R.; KRECH, T. Antibacterial activity of oral antibiotics against anaerobic bacteria. *Chemotherapy*, 39: 169-174, 1993.

CUMMING, C.G. The use of cefadroxil in the treatment of acute orofacial infections. *Journal of Dentistry*, 12: 247-251, 1984.

CVEK, M.; GRANATH, L.; CLEATON-JONE SP.; AUSTIN, J. Hard tissue barrier formation in pulpotomized monkey teeth capped with cyanocrilate or calcium hydroxide for 10 and 60 minutes. *Journal of Dental Research*, 66: 1166-1174, 1987.

DAILEY, Y.M.; MARTIN, M.V. Are antibiotics being used appropriately for emergency dental treatment? *British Dental Journal*, 191: 391-393, 2001.

DAHLÉN, G.; WIKSTRÖM, M.; RENVERT, S.; GMÜR, R.; GUGENHEIM, B. Biochemical and serological characterization of *Bacteroides intermedius* strains isolated from the deep periodontal pocket. *Journal of Clinical Microbiology*, 28: 2269-2274, 1990.

DAHLÉN, G.; PIPATTANAGOVIT, P.; ROSLING, B.; MÖLLER, A.J.R. A comparison of two transport media for saliva and subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 8: 375-382, 1993.

DAVIES, A.H.; MCFADZEN, J.A.; SQUIRES, S. Treatment of Vincent's stomatitis with metronidazole. *British Medical Journal*, 1: 1149-1150, 1964.

DE DEUS, Q.D. *Endodontia*. 5<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1992.

DE DEUS, Q.D. Frequency, location, and direction of the lateral, secondary, and accessory canal. *Journal of Endodontics*, 1: 361-366, 1975.

DONGARI, A.; LAMBRIANIDIS, T. Periodontally derived pulp lesions. *Endodontic and Dental Traumatology*, 4: 49-54, 1988.

DOUGHERTY, W.J.; BAE, K.S.; WATKINS, B.J.; BAUMGARTNER, J.C. Black-pigmented bacteria in coronal and apical segments of infected root canals. *Journal of Endodontics*, 24: 356-358, 1998.

DRUCKER, D.B.; LILLEY, J.D.; TUCKER, D.; GIBBS, A.C.C. The endodontic microflora revisited. *Microbios*, 71: 225-234, 1992.

DUERDEN B.I. Role of the reference laboratory in susceptibility testing of anaerobes and a survey of isolates referred from laboratories in England and Wales during 1993-1994. *Clinical and Infectious Disease*, 20 (Suppl. 2): S180-S186, 1995.

DYRNOCK, D.; WEIGHTMAN, A.; SCULLY, C.; WADE, W.G. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *Journal of Clinical Microbiology* 34: 537-542, 1996.

FABRICIUS, L.; DAHLÉN, G.; HOLM, S.E.; MÖLLER, A.J.R. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 90, 200-206, 1982.

FASS, R.J. Erythromycin, clarithromycin, and azitromycin: use of frequency distribution curves, scattergrams, and regression analyses to compare in vitro activities and describe cross-resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37: 2080-2086, 1993.

FAZAKERLEY, M.W.; MCGOWAN, P.; ARDÍ, P.; MARTÍN, M.V. A comparative of cephadrine, amoxicillin and phenoxymethylpenicillin in the treatment of acute dentoalveolar infection. *British Dental Journal*, 174: 359-363, 1993.

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

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

FOUAD, A.F.; RIVERA, E.M.; WALTON, R.E. Penicillin as a supplement in resolving the localized acute apical abscess. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 81: 590-595, 1996.

GARRET, E.R. Kinetics of antimicrobial action. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, 14: 54-85, 1978.

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. *Journal of Periodontology*, 65: 56-61, 1994.

GILL, C.J.; PALLASCH, T.J. Clindamycin associated pseudomembranous colitis: a potentially fatal adverse drug reaction. *Journal of the American Dental Association*, 102: 507-509, 1981.

GILL, Y.; SCULLY, C. Orofacial odontogenic infections: review of microbiology and current treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 70: 155-8, 1990.

GILMER, T.L.; MOODY, M. A study of the bacteriology of alveolar abscess and infected root canals. *Journal of the American Medical Association*, 63: 2023-2024, 1914.

GOLDESTINE, E.J.C.; CITRON, D.M. Comparative in vitro activities of amoxicillin-clavulanic acid and imipenem against anaerobic bacteria isolated from community hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 29: 158-160, 1986.

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

GOMES, B.P.F.A. *Investigação dos microrganismos envolvidos na sintomatologia e no insucesso do tratamento endodôntico*. Tese de Livre-Docência. Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, 2002.

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

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

GOMES, B.P.F.A.; DRUCKER, D.B.; LILLEY, J.D. Recovery of *Porphyromonas endodontalis* and *Porphyromonas gingivalis* by two different sampling techniques. *Journal of Dental Research*, 74: 848, 1995.

GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal*, 29: 69-75, 1996a.

GOMES, B.P.F.A.; LILLEY, J.D.; DRUCKER, D.B. Clinical significance of dental root canal microflora. *Journal of Dentistry*, 24: 47-55, 1996b.

GOMES, B.P.F.A.; DRUCKER, D.B.; LILLEY, J.D. Association of endodontic signs and symptoms with particular combinations of specific bacteria. *International Endodontic Journal*, 29: 69-75, 1996c.

GONÇALVES, R.B.; MOUTON, C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. *Journal of Endodontics*, 25: 336-340, 1999.

GRAD, H.A. Antibiotics in endodontics: therapeutic considerations. *Alpha Omegan*, 90: 64-72, 1997.

GREENBERG, R.N.; JAMES, R.B.; MARIER, R.L.; WOOD, W.H.; SANDERS, C.V. Microbiologic and antibiotic aspects of in the oral and maxillofacial region. *Journal of Oral Surgery*, 37: 873-884, 1979.

GREENSTEIN, G. The role of metronidazole in the treatment of periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 64: 1-15, 1993.

GROPPO, FC. *Influência da evolução do tecido granulomatoso sobre a biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo ex-vivo, em ratos.* Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas -Piracicaba, 1996.

GUTMANN, J.L.; HARRISON, J.W. *Surgical endodontics.* 1ª ed.. St Louis. Tokyo: Yshiyaku EuroAmerica, Inc., 387-396, 1994.

HAAPASALO, M.M.; RANTA, H.; RANTA, K.; SHAH, H. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. *Infection and Immunology*, 53: 149-153, 1986.

HAAPASALO, M.; RANTA, K.; RANTA, H. Mixed anaerobic periapical infection with sinus tract. *Endodontic and Dental Traumatology*, 3: 83-85, 1987.

HAAPASALO, M. *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. *Endodontic and Dental Traumatology*, 5: 1-10, 1989.

HANDAL, T.; OLSEN, I. Antimicrobial resistance with focus on oral beta-lactamases. *European Journal of Oral Science*, 108: 163-174, 2000.

HARRISON, J.W. Antibiotics not always necessary. *Journal of the American Dental Association*, 130: 782, 1999.

HASHIMURA, T.; SATO, M.; HOSHINO, E. Detection of *Slackia exigua*, *Mogibacterium timidum* and *Eubacterium saephemum* from pulpal and periradicular samples using the Polymerase Chain Reaction (PCR) method. *International Endodontic Journal*, 34: 463-470, 2001.

HASHIOKA, K.; YAMASAKI, M.; NAKANE, A.; HORIBA, N.; NAKAMURA, H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *Journal of Endodontics*, 18: 558-561, 1992.

HEIMDAHAL, A. Culturing the exudate of an odontogenic infection-A useful procedure? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 90: 2-4, 2000 (letter to the editor).

HEIMDAHL, A.; NORD, C.E. Treatment of orofacial infections of odontogenic origin. *Scandinavian Journal of Infectious Disease*, Suppl 46: 101-5, 1985.

HEIMDAHL, A.; VON KONOW, L.; SATOH, T.; NORD, C.E. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. *Journal of Clinical Microbiology*, 22: 299-302, 1985.

HILL-SMITH, H.; SCHUMAN, N.J. Antibiotic therapy in pediatric dentistry II. Treatment of oral infection and management of systemic disease. *Pediatric Dentistry*, 5: 450,1983.

HIRAI, K.; TAGAMI, A.; OKUDA, K. Isolation and classification of anaerobic bacteria from pulp cavities of nonvital teeth in man. *Bulletin of Tokyo Dental College*, 32: 95-8, 1991.

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

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

JOHNSON, C.C. Susceptibility of anaerobic bacteria to  $\beta$ -lactam antibiotics in the United States. *Clinical and Infectious Diseases*, 16 (Suppl4): S371-6, 1993.

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. *Journal of Endodontics*, 26: 599-604, 2000.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H.R.; FIZGERALD, R.J. The effect of surgical exposure of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 20: 340-349, 1965.

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

KARLOWSKY, J.; FERGUSON, J.; ZHANEL, G. A review of commonly prescribed oral antibiotics in general dentistry. *Journal of Canadian Dental Association*, 59: 292-299, 1993.

KASPER, D.L. The polysaccharide capsule of *Bacteroides fragilis* subspecies *fragilis*: Immunochemical and morphologic definition. *Journal of Infectious Diseases*, 133: 79-89, 1976.

KATSANIS, G.P.; SPARGO, J.; FERRARO, M.J.; SUTTON, L.; JACOBY, G.A. Detection of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum,  $\beta$ -lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 32: 691-696, 1994.

KHERNALEELAKUL, S.; BAUMGARTNER, J.C.; PRUKSAKORN, S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* 94: 746-755, 2002.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, W.C. *Diagnóstico microbiológico - Texto e Atlas Colorido*, 5ª ed, Ed, Medsi, Rio de Janeiro, 2001.

KONONEN, E.; NYFORS, S.; MATTO, J.; ASIKAINEN, S.; JOUSIMIES-SOMER, H.  $\beta$ -lactamase production by oral pigmented *Prevotella* species isolated from young children. *Clinical and Infectious Diseases*, 25(Suppl 2): S272-274, 1997.

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

KÜLEKÇI, G.; INAC, D.; KOCAK, H.; KAPOGLU, C.; GUMRU, O.Z. Bacteriology of dentoalveolar abscesses in patients who have received empirical antibiotic therapy. *Clinical and Infectious Disease*, 23, (Suppl 1), 51-53, 1996.

KURIYAMA, T.; KARASAWA, T.; NAKAGAWA, K.; SAIKI, Y.; YAMAMOTO, E.; NAKAMURA, S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral radiology and Endodontics*, 90: 600-608, 2000.

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 Microbiology and Immunology*, 16: 10-15, 2001.

LABRIOLA, J.D.; MASCARO, J.; ALPERT, B. The microbiologic flora of orofacial abscesses. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 41: 711-714, 1983.

LANGELAND, K.; BLOCK, R.M.; GROSSMAN, L.I. A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens. *Journal of Endodontics*, 3: 8-23, 1977.

LE GOFF, A.; BUNETEL, L.; MOUTON, C.; BONNAURE-MALLET, M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbiology and Immunology*, 12: 318-322, 1997.

LEWIS, M.A.O.; MACFARLANE, T.W.; MCGOWAN, D.A. Quantitative bacteriology of acute dental alveolar abscesses. *Journal of the Medicine Microbiology*, 21: 101-104, 1986a.

LEWIS, M.A.O.; MCGOWAN, D.A.; MACFARLANE, T.W. Short-course high-dose amoxicillin in the treatment of acute dentoalveolar abscess. *British Dental Journal*, 161: 299-302, 1986b.

LEWIS, M.A.O.; MACFARLANE, T.W.; MCGOWAN, D.A.; MACDONALD, D.G. Assessment of the pathogenicity of bacterial species isolated from acute dental alveolar abscesses. *Journal of the Medicine Microbiology*, 27: 109-116, 1988.

LEWIS, M.A.O.; MACFARLANE, T.W.; MCGOWAN, D.A. A microbiological and clinical review of the acute dental alveolar abscess. *British Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 28: 359-366, 1990.

LEWIS, M.A.O.; CARMICHAEL, F.; MACFARLANE, T.W.; MILLIGAN, S.G. A randomised trial of co-amoxiclav (*Augmentin*) versus penicillin V in the treatment of acute dentoalveolar abscess. *Brazilian Dental Journal*, 175: 169-174, 1993.

LEWIS, M.A.O.; PARKHURST, C.L.; DOUGLAS, C.W.I.; MARTIN, M.V.; ABSI, E.G.; BISHOP, P.A.; JONES, S.A. Prevalence of penicillin resistant bacteria in acute suppurative oral infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35: 785-791, 1995.

LIVERMORE, D.M. Determinants of the activity of  $\beta$ -lactamase inhibitors combinations. *Journal Antimicrobial Therapy*, 31 (Suppl A): 9-21, 1993.

MAKKAR, S.; NISSAN, R.; WILKINSON, D.; SELA, M.; STEVENS, R. *Porphyromonas endodontalis* and symptoms from teeth with endodontic infections. *Journal of Endodontics*, 29: 283, 1999.

MARSH, P.; MARTIN, M. *Oral Microbiology*. 3<sup>rd</sup> edn. London, UK: Chapman & Hall, 1992.

MEDEIROS, A.A. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generation of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clinical Infection and Disease*, 24 (Suppl 1): S19-45, 1997.

MILES, M. Anesthetics, analgesics, antibiotics, and endodontics. *Dental Clinics of North America*, 28: 865-882, 1984.

MILLER, W.D. An introduction to the study of the bacteriopathology of the dental pulp. *Dental Cosmos*, 36: 505-528, 1894.

MOENNING, J.E.; NELSON, C.L.; KOHLER, R.B. The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 47: 976-985, 1989.

MOLANDER, A.; REIT, C.; DAHLEN, G.; KVIST, T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, 31: 1-7, 1998.

MÖLLER, A.J.R. *Microbial examination of root canals and periapical tissues of human teeth; methodological studies*. Göteborg, Sweden: Akademiförlaget, 1966.

MÖLLER, A.J.R.; FABRICIUS, J.R.; DAHLÉN, G.; JÖHMAN, A.E.; HEYDEN, G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 890: 475-484, 1981.

MONTGOMERY, E.H. Antibióticos antibacterianos. In Neidle EA, Yagiela JA. *Farmacologia e terapêutica para dentistas*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

MORAES, S.R.; SIQUEIRA, JR J.F.; COLOMBO, A.P.; RÔÇAS, I.N.; FERREIRA, M.C.S.; DOMINGUES, R.M.C.P. 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. *Journal of Endodontics* 28: 86-89, 2002.

MORSE, D.R. The endodontic culture technique: An impractical and unnecessary procedure. *Dental Clinics of North America*, 14: 793-806, 1971.

MORSE, D.R. In: COHEN S. & BURNS R.C. *Pathways of the pulp*. 4<sup>a</sup> ed. St. Louis, Mosby Co., 1987.

NACHNANI, S.; SCUTERI, A.; NEWMAN, M.G.; AVANESSIAN, A.B.; LOMELI, S.L. *E-test*: A new technique for antimicrobial susceptibility testing for periodontal microorganisms. *Journal of Periodontology*, 63: 576-583, 1992.

NAGAOKA, S.; MIYASAKI, Y.; LIU, H.J.; IWAMOTO, Y.; KITANO, M.; KAWAGOE, M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *Journal of Endodontics*, 21: 70-73, 1995.

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

NAIR, P.N.R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; KAHNBERG, K.E.; SUNDQVIST, G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *Journal of Endodontics*, 16: 580-588, 1990a.

NAIR, P.N.R.; SJÖGREN, U.; KREY, G.; SUNDQVIST, G. Therapy-resistant foreign body giant cell granuloma at the periapex of a root-filled human tooth. *Journal of Endodontics*, 16: 589-595, 1990b.

NAKAMURA, M.; MASHINO, P.A.; SLOTS, J. Dipeptidyl arylamidase activity of *Bacteroides gingivalis*. *Microbiology Letter* 24: 157-160, 1984.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: approved standard*. 3<sup>th</sup> ed. NCCLS document M100-S8 M11-A4, tabela 1,17. Villanova. Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.

NATKIN, E. Treatment of endodontic emergencies. *Dental Clinics of North America*, 18: 243-255, 1974.

NAVASHIN, S.M.; FOMINA, I.P.; FIRSOV, A.A.; CHERNYKH, V.M.; KUZNETSOVA, S.M. A dynamic model for in-vitro evaluation of antimicrobial action by simulation of the pharmacokinetic profiles of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 23: 389-399, 1989.

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

NISENGARD, J.R.; NEWMAN, M.G. *Microbiologia Oral e Imunologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A. 2<sup>a</sup> ed., 1997.

NISSAN, R.; MAKKAR, S.R.; SELA, M.N.; STEVENS, R. Whole genomic DNA probe for detection of *Porphyromonas endodontalis*. *Journal of Endodontics*, 26: 217-20, 2000.

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

OLIVEIRA, J.C.M.; SIQUEIRA, JR J.F.; ALVES, G.B.; HIRATA, JR R.; ANDRADE, A.F. Detection of *Porphyromonas endodontalis* in infected root canals by 16S rRNA gene-directed polymerase chain reaction. *Journal of Endodontics*, 26: 729-732, 2000.

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

ONDERDONK, T.W. Treatment of unfilled root canals. *International Dental Journal*, 22: 20-22, 1901.

PALLASCH, T.J. Antibiotics in endodontics. *Dental Clinics of North America*, 23: 737-746, 1979.

PALMER, J.; CHEN, S.; GOTTLIEB, T.; SCHIO, F.; GILBERT, G. False resistance to metronidazole of anaerobic bacteria using the E-test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 34: 598-600, 1994.

PANTERA, JR E.A.; ZAMBON, J.J.; SHIH-LEVINE, M. Indirect immunofluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. *Journal of Endodontics*, 14: 218-23, 1988.

PAPANOU, P.N.; MADIANOS, P.N.; DAHLÉN, G.; SANDROS, J. "Checkerboard" versus culture: a comparison between two methods for identification of subgingival microbiota. *European Journal of Oral Science*, 105: 389-396, 1997.

PATERSON, A.S.; CURZON, M.E.J. The effect of amoxycillin versus penicillin V in the treatment of acutely abscessed primary teeth. *British Dental Journal*, 174: 443-449, 1993.

PECIULIENE, V.; BALCIUNIENE, I.; ERIKSEN, H.M.; HAAPASALO, M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *Journal of Endodontics*, 26: 593-595, 2000.

- PECIULIENE, V.; REYNAUD, A.H.; BALCIUNIENE, I.; HAAPASALO, M. Isolation of yeast and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *International Endodontic Journal*, 34: 429-434, 2001.
- PETERS, D.D. Evaluation of prophylactic alveolar trephination to avoid pain. *Journal of Endodontics*, 6: 518-526, 1980.
- PETERS, L.B.; WESSELINK, P.R.; VAN WINKELHOFF, A.J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *International Endodontic Journal*, 35: 698-702, 2002.
- PINHEIRO, E.T. GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R; SOUSA, E.L.R; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J. Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal*, 36: 1-11, 2003.
- POULET, P.P.; DUFFAUT, D.; LODTER, J.P. Metronidazole susceptibility testing of anaerobic associated with periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 26: 261-263, 1999a.
- POULET, P.P.; DUFFAUT, D.; LODTER, JP. Evaluation of the E-test for determining the in-vitro susceptibilities of *Prevotella intermedia* isolates to metronidazole. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43: 610-611, 1999b.
- RAMS, T.E.; FEIK, D.; LISTGARTEN, M.A.; SLOTS, J. *Peptostreptococcus micros* in human periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 7: 1-6, 1992.
- RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K.; TALLY, F.P. Antimicrobial resistance in *Bacteroides*. *Clinical and Infectious Disease*, 16 (Suppl 4): S390-400, 1993.

ROACHE, Y.; YOSHINORI, R.N. In vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 40: 353-357, 1997.

ROSEMBLATT, J.E.; BROOK, I. Clinical relevance of susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Clinical and Infectious Disease*, 16 (Suppl4): S446-S448, 1993.

ROSEMBLATT, J.E.; GUSTAFSON, D.R. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *Diagnostic Microbiology of Infectious Disease*, 22: 279-284, 1995.

ROTIMI, V.O.; KHOURSHEED, M.; BRAZIER, J.S.; JAMAL, W.Y. *Bacteroides* species high resistant to metronidazole: an emerging clinical problem? *Clinical Microbiology and Infection*, 5: 166-169, 1999.

SABISTON, C.B.; GOLD, W.A. Anaerobic bacteria in oral infections. *Oral Surgery*, 38: 187-192, 1974.

SABISTON, C.B.; GRIGSBY, W.R.; SEGERSTROM, N. Bacterial study of pyogenic infections of dental origin. *Oral Surgery*, 41: 430-435, 1976.

SANDS, T.; PYNN, B.R.; KATSIKIERIS, N. Odontogenic infections: Part two. Microbiology, antibiotics and management. *Oral Health*, 85: 11-29, 1995.

SATO, T.; HOSHINO, E.; UEMATSU, H.; NODA, T. Predominant obligate anaerobes in necrotic pulps of human intact teeth. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 6: 269-275, 1983.

SCHIEVEN, B.C.; MASSEY, V.E.; LANNIGAN, R.; HUSSAIN, Z. Evaluation of susceptibility of anaerobic organisms by the E-test and the reference ágar dilution method. *Clinical and Infectious Diseases*, 20 (Suppl 2): S337-338, 1995.

SEN, B.H.; PISKIN, B.; DERMIRCI, T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endodontic and Dental Traumatology*, 11: 6-9, 1995.

SERENE, T.P.; ANDERSON, D.L. Isolation of mycoplasma from human root canals. *Journal of Dental Research*, 46: 395-399, 1967.

SERENE, T.P.; McKELY, B.D.; SCARAMALLA, J.M. Endodontic problems resulting from surgical fistulation: report of two cases. *Journal of the American Dental Association*, 96: 101-104, 1978.

SHINN, D.L.S. Metronidazole in acute ulcerative gingivitis. *Lancet*, 1: 1191, 1962 (letter).

SIQUEIRA, Jr J.F. *Avaliação da invasão bacteriana de túbulos dentinários e da atividade antibacteriana de medicamentos intracanáis*. Tese de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1996.

SIQUEIRA, JR J.F. *Tratamento das infecções endodônticas*. Medsi, Rio de Janeiro, 1997.

SIQUEIRA., Jr J.F.; MAGALHÃES, F.A.C.; LIMA, K.C.; UZEDA, M. Pathogenicity of facultative and obligate anaerobe bacteria in monoculture and combined with either *Prevotella intermedia* or *Prevotella nigrescens*. *Oral Microbiology and Immunology*, 13: 368-372, 1998.

SIQUEIRA, JR J.F.; ROÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. Checkerboard dna-dna hybridization analysis of endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 89: 744-748, 2000.

SIQUEIRA, JR J.F.; ROÇAS, I.N.; OLIVEIRA, J.C.M.; SANTOS, K.R.N. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*, 27: 563-566, 2001a.

SIQUEIRA, JR J.F.; ROÇAS, I.N.; FAVIERI, A.; OLIVEIRA, J.C.M.; SANTOS, K.R.N. Polymerase chain reaction detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. *International Endodontic Journal*, 34: 280-284, 2001b.

SIQUEIRA, JR J.F.; ROÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA-DNA hybridization. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 92: 451-457, 2001c.

SIQUEIRA, Jr J.F.; ROÇAS, I.N.; SOUTO, R.; UZEDA, M.; COLOMBO, A.P. *Actinomyces* species, *Streptococci* and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *Journal of endodontic*, 28: 168-172, 2002

SIREN, E.K.; HAAPASALO, M.P.P.; RANTA, K.; SALMI, P.; KEROSUO, E.N.J. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal*, 30: 91-95, 1997.

SLOTS, J. Detection of colonies of *Bacteroides gingivalis* by a rapid fluorescent assay for trypsin-like activity. *Oral Microbiology and Immunology*, 2: 139-141, 1987.

SLOTS, J.; RAMS, T.E. Antibiotics in periodontal therapy: advantages and disadvantages. *Journal of Clinical Periodontology*, 17: 479-493, 1990.

SLOTS, J.; PALLASH, T.J. Dentists'role in halting antimicrobial resistance. *Journal of Dental Research*, 75: 1338-1341, 1996.

SOUSA, E.L.R. *Estudo bacteriológico de canais radiculares associados a abscessos periapicais*. Tese de Mestrado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, 2000.

SOUSA, E.L.R.; FERRAZ, C.C.R.; PINHEIRO, E.T.; TEIXEIRA, F.B.; SOUZA-FILHO, F.J.; GOMES, B.P.F.A. Bacteriological study in dental root canals with purulent exudate. Anaerobe 2000- International Congress of the Confederation of Anaerobe Societies, Manchester, UK. 156, 2000.

SOUZA-FILHO, F.J.; GOMES, B.P.F.A.; FERRAZ, C.C.R.; TEIXEIRA, F.B.; ZAIA, A.A. Drenagem de abscessos periapicais. In: *Endodontia – Trauma, Odontologia*. APCD, Ed. Artes médicas, cap. 7, 2002.

SPANGLER, S.K.; APPELBAUM, P.C. Oxyrase a method which avoids CO<sub>2</sub> in the incubation atmosphere for anaerobic susceptibility testing of antibiotics affected by CO<sub>2</sub>. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 460-2, 1993.

SPANGLER, S.K.; JACOBS, M.R.; APPELBAUM, P.C. Susceptibilities of 201 anaerobes to erythromycin, azithromycin, clarithromycin and roxithromycin by oxyrase agar dilution and E-test methodologies. *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1366-1367, 1995.

STUBBS, S.; PARK, S.F.; BISHOP, P.A.; LEWIS, M.A.O. Direction of *Prevotella intermedia* and *P. nigrescens* in suppurative oral infection by amplification of 16S rRNA gene. *Journal of Medical Microbiology*, 48: 1017-1022, 1999.

SUNDQVIST, G. *Bacteriologic studies of necrotic dental pulps*. Odontological Dissertation n° 7, University of Umea, Sweden, 1976.

SUNDQVIST, G.; ECKERBOM, M.I.; LARSSON, A.P.; SJÖGREN, U.T. Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. *Infection and Immunity*, 25: 685-693, 1979.

SUNDQVIST, G.; CARLSSON, J.; HERRMANN, B.; HÖFLING, J.F.; VÄÄTÄINEN, A. Degradation in vivo of the C3 protein of guinea-pig complement by a pathogenic strain of *Bacteroides gingivalis*. *Scandinavian Journal and Dental Research*, 92: 14-24, 1984.

SUNDQVIST, G.; CARLSSON, J.; HERRMANN, B.; TERNVIK, A. Degradation of human immunoglobulins G and M complement factors C3 and C5 by black-pigmented *Bacteroides*. *Journal of Medical Microbiology*, 43: 85-94, 1985.

SUNDQVIST, G.; JOHANSSON, E.; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. *Journal of Endodontics*, 15: 13-19, 1989.

SUNDQVIST, G. Ecology of root canal flora. *Journal of Endodontics*, 18: 427-430, 1992a.

SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology*, 7: 257-262, 1992b.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 78: 522-530, 1994.

SUNDQVIST, G.; FIGDOR, D.; SJÖGREN, U. Microbiology analyses of teeth with endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*. 85: 86-93, 1998

SYED, A.S.; LOESCHE, W.J. Survival of human dental plaque flora in various transport media. *Applied Microbiology*, 24: 638-644, 1972.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal*, 31: 311-325, 1998.

TALLY, F.P. Factors affecting antimicrobial agents in an anaerobic abscess, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 4: 299-302, 1978.

TANNER, A.C.R.; LISTGARTEN, M.A.; EBERSOLE, J.L.; STRZEMPKO, M.N. *Bacteroides forsythus* sp. Nov., a slow-growing fusiform *Bacteroides* sp. from the human oral cavity. *International Endodontic Journal*, 36: 213-221, 1986.

THILO, B.E.; BAEHNI, P.; HOLZ, J. Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. *Journal of Endodontics*, 12: 202-205, 1986.

TOMASZ, A. Multiple-antibiotic-resistant pathogenic bacteria. A report on the Rockefeller University Workshop. *The New England Journal of Medicine*, 28: 1247-1251, 1994.

TORABINEJAD, M.; KIGER, R.D. A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 59: 198-200, 1985.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 6ed. Porto Alegre, RS, Brasil: Artes Médicas Sul, 2000.

TRONSTAD, L.; BARNETT, F.; RISO, K.; SLOTS, J. Extraradicular endodontic infections. *Endodontic and Dental Traumatology*, 3: 86-90, 1987.

TROPE, M.; TRONSTAD, L.; ROSENBERG, E.S.; LISTGARTEN, M. Dark-field microscopy as a diagnostic aid in differentiating exudates from endodontic and periodontal abscesses. *Journal of Endodontics*, 14: 35-38, 1988.

TUOMANEN, E.; LINDQUIST, S.; SANDE, S.; GALLEN, M.; LIGHT, K.; GAGE, D.; NORMARK, S. Coordinate regulation of  $\beta$ -lactamase induction and peptidoglycan composition by the *amp* operon. *Science*, 251: 201-204, 1991.

VAFAR, N.M.; DOBECK, J.M.; WARWINGTON, M.L.; DIBART, S.; HARRIS, M.; SKOBE, Z. DNA analysis of bacteria in symptomatic endodontically treated teeth. *Journal of Endodontics*, 25: 290, 1999.

VAN DALEN, P.J.; VAN DEUTEKOM-MULDER, E.C.; GRAAFF, J.; VAN STEENBERGEN, J.M. Pathogenicity of *Peptostreptococcus micros* morphotypes and *Prevotella* species in pure and mixed culture. *Journal of Medical Microbiology*, 47:135-140, 1998.

VAN STEENBERGEN, T.J.M.; KASTELEIN, P.; TOUW, J.J.A.; GRAAFF, J. Virulence of black-pigmented *Bacteroides* strains from periodontal pockets and other sites in experimentally induced skin lesions in mice. *Journal of Periodontal Research*, 17: 41-49, 1982.

VAN STEENBERGEN, T.J.M.; VAN WINKELHOFF, A.J.; GRAAFF, J.; DUERDEN B.I. Antibiotic susceptibility of black pigmented Gram-negative anaerobes. *Immunology and Medical Microbiology*, 6: 229-234, 1993.

VAN WINKELHOFF, A.J.; CARLEE, A.W.; DE GRAAFF, J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. *Infection and Immunity*, 49: 494-497, 1985.

VAN WINKELHOFF, A.J.; CLEMENT, M.; DE GRAAFF, J. Rapid characterization of oral and nonoral pigmented *Bacteroides* species with the ATB Anaerobes ID system. *Journal of Clinical Microbiology*, 26: 1063-1065, 1988.

VIGIL, G.V.; WAYMAN, B.E.; DAZEY, S.E.; FOWLER, C.B.; BRADLEY, D.V. Identification and antibiotic sensitivity of bacteria isolated from periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 23: 110-114, 1997.

VOGELMAIN, B.; CRAIG, W.A. Kinetics of antimicrobial activity. *Journal of Pediatric*, 108: 835-840, 1986.

WALKER, C. Antimicrobial agents and chemotherapy. In: Slots J., Taubman M.A. eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology*, St. Louis, MO, USA: Mosby Year Book, 242-264, 1992.

WALTON, R.E.; CHIAPPINELLI, J. Prophylactic penicillin: effect on posttreatment symptoms following root canal treatment of asymptomatic periapical pathosis. *Journal of Endodontics*, 19: 466-470, 1993.

WASFY, M.O.; MCMAHON, K.T.; MINAH, G.E.; FALKLER, W.A. Microbiological evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiology and Immunology*, 7: 100-105, 1992.

WEXLER, H.M.; MOLITORIS, E.; FINEGOLD, S.M. Effect of  $\beta$ -lactamase inhibitors on the activities of various  $\beta$ -lactam agents against anaerobic bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 1219-1224, 1991.

WEXLER, H.M. Susceptibility testing of anaerobic bacteria: myth, magic, or method? *Clinical Microbiology Reviews*, 4: 470-484, 1991.

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

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

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

WITTIGOW, W.C.; SABISTON, C.P. Microorganisms from pulpal chambers of intact teeth with necrotic pulps. *Journal of Endodontics*, 1: 168-171, 1975.

WUST, J.; HARDEGGER, U. Comparison of the E-test and a reference ágar dilution method for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Disease*, 11: 1169-1173, 1992.

YAMAMOTO, K.; FUKUSHIMA, H.; TSUCHYA, H.; SAGAWA, H. Antimicrobial susceptibilities of *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, and *Bacteroides* isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *Journal of Endodontics*, 15: 112-116, 1989.

YOSHIDA, M.; FUKUSHIMA, H.; YAMAMOTO, K.; OGAWA, K.; TODA, T.; SAGAWA, H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals with periapical pathosis. *Journal of Endodontics*, 13: 24-28, 1987.

ZAVISTOSKI, J.; DZINK, J.; ONDERDONK, A.; BARTLETT, J. Quantitative bacteriology of endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 49: 171-174, 1980.

ZELDOW, B.J.; INGLE, J.I. Management of periapical infection: antibiotic sensivity of bacteria isolated from root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology*, 15: 721-726, 1962.

## ANEXOS

### **ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecimento específico para a pesquisa**

#### **Título: “Análise microbiológica de canais radiculares associados com abscessos periapicais e a suscetibilidade de bactérias anaeróbias prevalentes”**

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

Neste estudo iremos:

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

- Abscessos periapicais são caracterizados por acúmulo de pus nos tecidos ao redor da raiz dental, em geral, devido à presença de bactérias no interior do canal radicular.

b) determinar se há relação destas bactérias com sinais e sintomas

c) determinar se há relação destas bactérias com a localização dos abscessos;

d) determinar a frequência da localização dos abscessos encontrados;

e) analisar a sensibilidade das bactérias isoladas de canais radiculares com abscessos periapicais, a diversos tipos de antibióticos.

Para que servirá a sua participação:

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

Como será feito?

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

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

Nesta pesquisa, depois de secar o canal, a ponta de papel absorvente será colocada num meio de cultura líquido (“meio” utilizado para manter as bactérias coletadas vivas), que será posteriormente analisado para verificação do crescimento desses microrganismos. O procedimento é indolor. Se caso venha sentir dor, esta dor não será por causa da coleta de bactéria e sim, devido à persistência dessa infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais (tecido que está ao redor do dente). Se a dor ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, você poderá ser atendido no Plantão de Urgência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 hs e de 13:30 às 17:30 hs, sendo que o atendimento realizado será o mesmo de rotina do Plantão, que é tirar a dor. Quanto ao tratamento do dente e a outro tipo de tratamento, você será orientado pelos profissionais do Plantão a procurar a Triagem da Faculdade ou outro tipo de Atendimento Odontológico, como já é feito com todos os pacientes que passam pelo Atendimento do Plantão (somente o alívio da dor e orientação para outro tipo de atendimento).

Pode ocorrer algum risco?

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

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

Como já mencionado o procedimento é indolor.

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

Quais são os benefícios?

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

Esclarecimentos sobre a pesquisa:

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

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

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

Se participar desta pesquisa não terá nenhum gasto financeiro. Se por acaso, houver necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além

das necessárias para o tratamento de canal convencional, os gastos com este deslocamento serão ressarcidos.

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

#### TERMO DE CONSENTIMENTO DO PACIENTE

Declaro para os devidos fins que eu, -----  
-----, me disponho a participar da pesquisa intitulada **“Análise microbiológica de canais radiculares associados com abscessos periapicais e a suscetibilidade de bactérias anaeróbias prevalentes”** e permito a divulgação dos dados clínicos e microbiológicos obtidos desta pesquisa. Estou ciente dos objetivos desta pesquisa e de todos os procedimentos e concordo com a metodologia para coleta de amostras microbiológicas do(s) dente(s) submetido(s) ao tratamento endodôntico, na Faculdade de Odontologia de Piracicaba- UNICAMP. Estou também ciente de minha liberdade de recusar a participar ou retirar o meu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem ser penalizado e sem prejuízo ao meu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Assinatura:

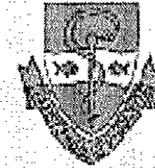
Local e data:



UNICAMP

## COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



### CERTIFICADO

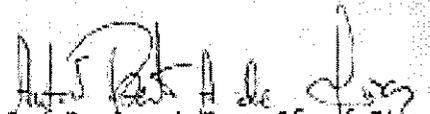
Certificamos que o Projeto de pesquisa intitulado "Análise microológica de canais radiculares associados a abscessos periapicais", sob o protocolo nº 061/2001, da Pesquisadora **EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA**, sob a responsabilidade de Prof. Dr. LUIZ VALDRIGHI, está de acordo com a Resolução 196/95 do Conselho Nacional de Saúde, de 10/10/96, tendo sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa - CEP.

Piracicaba, 29 de Junho de 2001

We certify that the research project with title "Microbiological analysis of root canals associated to periapical abscesses", protocol nº 061/2001 by Researcher **EZILMARA LEONOR ROLIM DE SOUSA** responsibility by Prof. Dr. LUIZ VALDRIGHI, is in agreement with the Resolution 196/95 from National Committee of Health/Health Department (ER) and was approved by the Ethical Committee in Research at the Piracicaba Dentistry School/UNICAMP (State University of Campinas).

Piracicaba, SP, Brazil, June 29 2001

  
Prof. Dr. Pedro Luis Rosalen  
Secretário  
CEP/FOOP/UNICAMP

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

## ANEXO 3 - Meio de transporte

### RTF – Reduced Transport Fluid \*

#### 1. 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.

#### 2. Fórmula

##### Solução 1 (Estoque)

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

##### Solução 2 (Estoque)

Fórmula.....	g/L
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

## **ANEXO 4 - Meios de cultura**

### **1) Não seletivos**

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

##### **1. 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.

##### **2. 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.

##### **3. Aparência**

Amarelo claro (sem a adição de sangue) ou vermelho devido à adição de sangue.

##### **4. Armazenagem**

Placas: até 7 dias a 4 °C no escuro.

##### **5. Inoculação**

Em superfície.

##### **6. Incubação**

Tempo e temperatura para cada microrganismo.

## 7. Fórmula

Fórmula.....	g/L
Infusão de sólidos de cérebro e coração.....	17,5
Proteose petona.....	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

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

#### 1. Descrição

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

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

#### 2. Método para reconstituição

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

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

\*Anaeróbios Gram-positivos não formadores de esporos e *Actinomyces*: ácido nalidíxico (Lab X091).

\**Clostridium* spp. (anaeróbios esporulados) e outros anaeróbios: neomicina (Lab X015).

Anaeróbios Gram-negativos: ácido nalidíxico + vancomicina (Lab X090).

### 3. Aparência

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

### 4. Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4° C no escuro.

### 5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

### 6. Incubação

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

### 7. Fórmula

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

Piruvato de sódio.....	1,0
Monoidrato HCL cisteína.....	1,0
Hemina.....	0,5
Vitamina K.....	0,001
L arginina.....	1,0
Pirofosfato solúvel.....	0,25
Succinato de sódio.....	0,5

PH: 7,4 ± 0,2

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

1. Descrição

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

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

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

2. Método para reconstituição

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

3. Aparência

Amarelo, claro, viscoso. Pode alterar a cor ao ter contato com a ação do oxigênio. Se o meio tornar-se avermelhado indica que o oxigênio está sendo absorvido, e o meio deve ser reaquecido para desoxigenar. Não pode reaquecer mais de uma vez.

4. Armazenagem do meio preparado

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

## 5. Inoculação

Se usado como um meio de cultura com sangue. Uma diluição mínima de 1:10 dever ser usada.

## 6. Incubação

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

## 7. Fórmula

Fórmula.....	g/L
Mistura de peptona.....	15,0
Extrato de Levedura.....	1,0
Tioglicolato de sódio.....	12,0
Cloreto de sódio.....	2,5
Ágar nº 1.....	0,75
L-cisteíne HCL.....	0,5
Resazurin.....	0,001
Bicarbonato de sódio.....	0,4
Hemina.....	0,005
Vitamina K.....	0,005

PH: 7,2 ± 0,2

### **d) Brucella Medium Base (OXOID, Hampshire-Inglaterra)**

#### 1. Descrição

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

#### 2. Método para reconstituição

Dispensar 22,5,0 g do pó em 500mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min. e resfriada a 47° C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado

Piruvato de sódio.....	1,0
Monoidrato HCL cisteína.....	1,0
Hemina.....	0,5
Vitamina K.....	0,001
L arginina.....	1,0
Pirofosfato solúvel.....	0,25
Succinato de sódio.....	0,5

PH: 7,4 ± 0,2

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

1. Descrição

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

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

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

2. Método para reconstituição

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

3. Aparência

Amarelo, claro, viscoso. Pode alterar a cor ao ter contato com a ação do oxigênio. Se o meio tornar-se avermelhado indica que o oxigênio está sendo absorvido, e o meio deve ser reaquecido para desoxigenar. Não pode reaquecer mais de uma vez.

4. Armazenagem do meio preparado

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

## 5. Inoculação

Se usado como um meio de cultura com sangue. Uma diluição mínima de 1:10 dever ser usada.

## 6. Incubação

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

## 7. Fórmula

Fórmula.....	g/L
Mistura de peptona.....	15,0
Extrato de Levedura.....	1,0
Tioglicolato de sódio.....	12,0
Cloreto de sódio.....	2,5
Ágar nº 1.....	0,75
L-cisteína HCL.....	0,5
Resazurin.....	0,001
Bicarbonato de sódio.....	0,4
Hemina.....	0,005
Vitamina K.....	0,005

PH: 7,2 ± 0,2

### **d) Brucella Medium Base (OXOID, Hampshire-Inglterra)**

#### 1.Descrição

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

#### 2. Método para reconstituição

Dispensar 22,5,0 g do pó em 500mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min. e resfriada a 47° C. Então adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado

de carneiro, 500µL de Hemina<sup>#</sup> e menadiona<sup>##</sup> preparados previamente, misturar bem e distribuir em placas de petri estéreis.

# A hemina favorece a produção de pigmento nos “*Bacteroides*” de pigmento negro.

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

### 3. Aparência

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

### 4. Armazenagem do meio preparado

Placas: até 7 dias a 4° C no escuro.

### 5. Inoculação

Em superfície, plaqueando para obter colônias puras.

### 6. Incubação

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

### 7. Fórmula

Fórmula.....	g/L
Peptona.....	10,0
Extrato de carne.....	5,0
Glicose.....	10,0
Cloreto de sódio.....	5,0
Ágar.....	15,0

PH: 7,5 ± 0,2

## 2) Meios seletivos

### a) Fastidious Anaerobe Agar (FAA)

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

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

Preparo:

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

Concentração final:

Ácido nalidíxico = 0,01mg/mL.

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

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

Preparo:

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

Concentração final:

Ácido nalidíxico = 0,01mg/mL

Vancomicina = 0,0025mg/mL

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

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

Preparo:

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

Concentração final: neomicina = 0,075mg/mL

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

Este meio é seletivo para anaeróbios Gram-negativos particularmente, bactérias pigmentadas de negro.

Preparo:

Para 500mL de água deionizada + FAA (g) + 5% de sangue de carneiro, utiliza-se um vidro de vancomicina (X090) e um vidro de Kanamicina (X018) que são diluídos em 5 mL de água destilada previamente, e em seguida a mistura é adicionada assepticamente ao meio estéril e resfriado à 47°C.

Concentração final:

Vancomicina = 0,0025mg/mL

Kanamicina = 0,075mg/mL

### **b) Suplemento anaeróbico G-N**

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

Suplemento seletivo para anaeróbios Gram-negativos.

##### 1.Composição

Cada vidro é suficiente para suplementar 500 mL de meio.

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

##### 2.Instruções para o uso

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

## ANEXO 5 - “Kits” de identificação

### a) RapID ID 32A

#### 1. Descrição

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

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

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

#### 2. Materiais

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

b) Reagente JAMES (#7 054 0)

Componente J 2183.....	0,5g
HCL N qsp.....	100mL

c) Reagente para redução de Nitrato

NIT 1 (#7 044 0)

Ácido Sulfanílico.....	0,8g
Ácido acético 5 N.....	100mL

NIT 2 (#7 045 0)

N-N-Dimetil-1-naftilamine.....	7,00g
Ácido acético 5 N.....	100mL

e) Reagente FB (#7 056 0)

Fast Blue.....	0,35g
Solvente orgânico qsp.....	100mL

f) Óleo mineral (#7 010 0)

“Swabs” estéreis

Padrão McFarland: 4 (#7 090 0)

Pipeta Plástica

Placas contendo meio de cultura (ágar + Sangue)

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

### 3. Procedimentos para a identificação

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

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

Uma pipeta estéril é introduzida no inóculo, e cada cúpula da fita é inoculada com 2 gotas da suspensão bacteriana. Após, duas gotas de óleo mineral é adicionado na cúpula URE (1.0).

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

## **b) RapID ANA II system**

### 1. Descrição

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

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

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

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

### 2. Materiais

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

KCl .....	7,5g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,5g
Água deionizada.....	1000 mL

pH: 7,5-9,5

1 frasco contendo 15 mL de reagente *Innova Spot Indole* (#30-9002)

1 frasco contendo reagente suficiente para 20 recipientes de RapID ANA II *Reagent*

Ingredientes reativos:

3-fenil 4-metilaninoacrolein.....	0,01 %
Ácido hidrolórico.....	0,1 %
Ácido acético.....	1 %
Detergente .....	0,1 %

*Swabs* estéreis

Pipetas estéreis

Padrão McFarland: 3

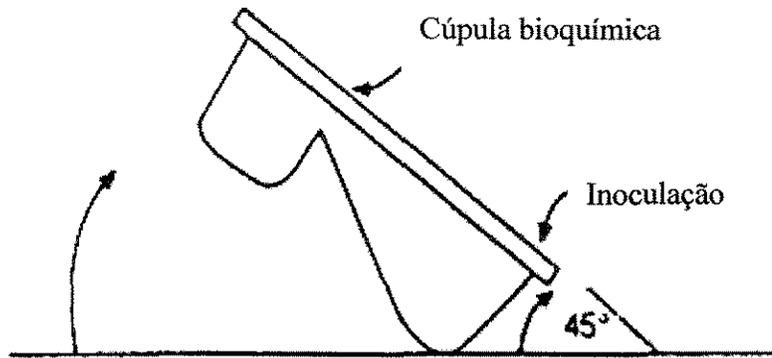
Placas contendo FAA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro

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

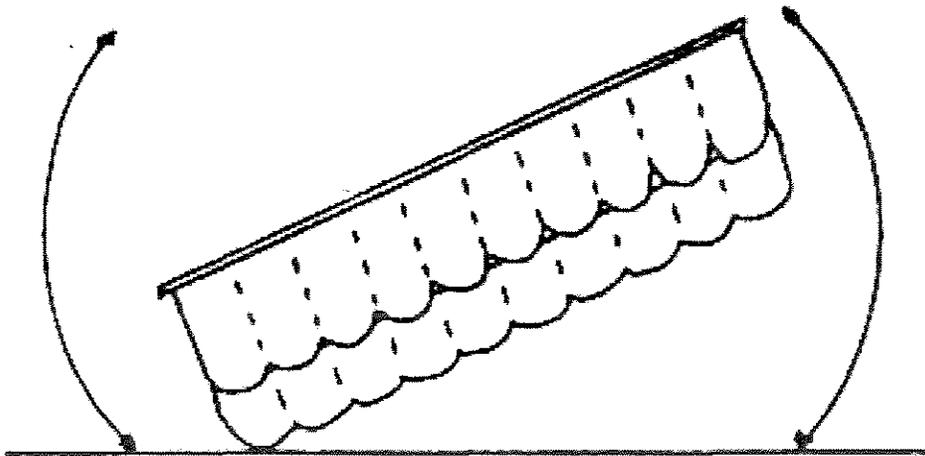
### 3. Procedimentos para identificação

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

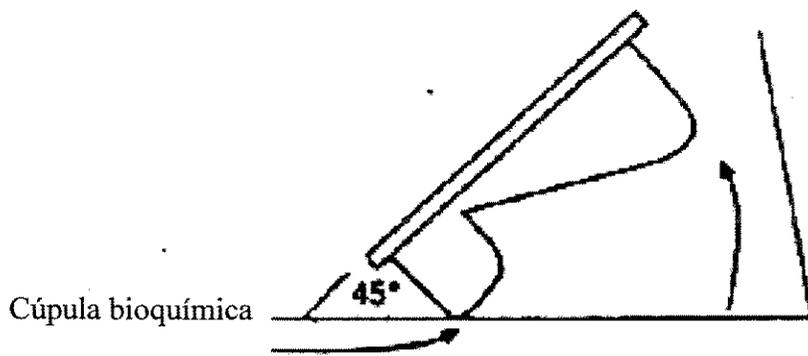
Um *swab* estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado devendo atingir no mínimo o equivalente ao padrão McFarland 3, é preparada (uma suspensão preparada com turbidez menor que padrão McFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são misturadas e agitadas (se necessário), e usado até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente descolada para a inoculação bacteriana. Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana, e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então, selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em superfície horizontal.



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



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



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

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

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

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

### **c) RapID NH system**

#### **1. Descrição**

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

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

O recipiente para teste de RapID NH contém 10 cavidades para reações (com enzimas desidratadas), que proporciona 12 “scores” para os testes, e se necessário, um décimo terceiro *score* de teste (NO<sub>2</sub>). As cavidades de teste 8, 9 e 10 são bifuncionais contendo 2 testes diferentes na mesma cavidade. O primeiro teste é obtido sem adição do

reagente, fornecendo o primeiro resultado. Na mesma cavidade é adicionado o reagente que fornece o segundo resultado. Os testes bifuncionais são distintos e não necessariamente relatados.

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

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

## 2. Materiais

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

KCl .....	7,5g
CaCl <sub>2</sub> .....	0,5g
Água deionizada.....	1000 mL

pH: 7,5-9,5

1 frasco contendo 15 mL de reagente *Innova Spot Indole* (#30-9002)

1 frasco contendo 15 mL de reagente *Innova Nitrate Reagent A* (#30-9003)

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

*Swabs* estéreis

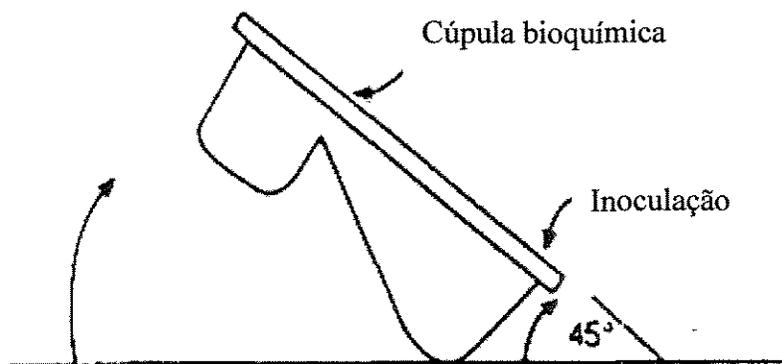
Padrão McFarland: 3

Placas contendo FAA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro

## 3. Procedimentos para identificação

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

Um *swab* estéril é usado para inoculação das colônias bacterianas no fluido de inoculação RapID. A suspensão do microrganismo que será testado devendo atingir no mínimo o equivalente ao padrão McFarland 3, é preparada (uma suspensão preparada com turbidez menor que padrão McFarland 3 pode comprometer o desenvolvimento do teste). As suspensões são misturadas e agitadas (se necessário), e usado até 15 minutos do preparo. A película de proteção do recipiente é devidamente descolada para a inoculação bacteriana. Uma pipeta estéril é introduzida na suspensão bacteriana, e todo o conteúdo é transferido para o recipiente de teste, na cúpula do canto direito superior. O recipiente para teste é então, selado novamente pela película de proteção, mantendo-o em superfície horizontal.



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

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

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

#### **d) API 20 Strep**

##### 1. Descrição

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

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

##### 2. Materiais

###### Meio de suspensão

Água destilada .....	2mL
GP <i>medium</i> (meio GP) .....	2mL
Cisteína .....	0,5g
Triptona .....	20,0g
Cloreto de Sódio.....	5,0g
Sulfito de Sódio .....	0,5g
Vermelho fenol .....	0,17g
Água desmineralizada qsp .....	1000 mL

pH: 7,8

###### Reagentes

NIN

Ninhidrina .....	7,0g
2-metoxietanol.....	100 mL

VP 1 (#7 042 0)

Hidróxido de Potássio .....	40,0g
Água .....	100mL

VP2 (#7 043 0)

$\alpha$ -naftol.....	6g
Etanol .....	100 mL

ZYM A (#7 047 0)

Tris-hidroximetil-aminometano .....	25g
Ácido hidroclórico .....	11 mL
Sulfato de lauril sódio.....	10g
Água .....	100 mL

ZYM B (#7 048 0)

Azul rápido BB.....	0,35g
2-metoxietanol .....	100 mL

Padrão de McFarland: 4 (#7 090 0)

Pipetas plásticas descartáveis estéreis

Óleo Mineral (#7 010 0)

*Swabs* estéreis

Placas contendo FAA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro

### 3.Procedimentos para Identificação

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

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

Cinco mL de água são adicionados ao recipiente de incubação para se manter uma atmosfera úmida e a seguir coloca-se nele uma tira de testes *API 20 Strep*.

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

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

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

### **e) API *Staph***

#### 1. Descrição

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

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

#### 2. Materiais

##### a) Meio de API *Staph*

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

PH:7,5

##### b) Reagentes

NIT 1 (#7 044 0)

Ácido Sulfanílico.....0,8g

Ácido acético 5 N.....100mL

NIT 2 (#7 045 0)

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

Ácido acético 5 N.....100mL

VP 1 (#7 042 0)

Hidróxido de Potássio .....40,0g

Água .....100mL

VP2 (#7 043 0)

$\alpha$ -naftol..... 6g

Etanol .....100 mL

ZYM A (#7 047 0)

Tris-hidroximetil-aminometano .....25g

Ácido hidrolórico .....11 mL

Sulfato de lauril sódio..... 10g

Água .....100 mL

ZYM B (#7 048 0)

Azul rápido BB..... 0,35g

2-metoxietanol .....100 mL

Padrão de McFarland: 0.5 (#7 090 0)

Pipetas plásticas descartáveis estéreis

Óleo Mineral (#7 010 0)

*Swabs* estéreis

Placas contendo FAA + 5% de sangue desfibrinado de carneiro

### 3.Procedimentos para Identificação

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

Gram, produção de catalase e requerimentos gasosos. Estes procedimentos permitem a identificação primária das espécies como cocos Gram-positivos, catalase positiva, e aeróbios/anaeróbios facultativos.

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

Cinco mL de água são adicionados ao recipiente de incubação para se manter uma atmosfera úmida e a seguir coloca-se nele uma tira de testes API *Staph*.

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

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

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

## ANEXO 6 - Testes adicionais

### a) 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.

#### 1)Espécimes

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.

#### 2)Reagentes/Suprimentos

Lâmpada Ultra-Violeta, Modelo UVL-56, comprimento de onda U.V. – 366nm

Metanol (100%)

Tubos testes (13x100)

Pipetas

Câmara escura

#### 3)Procedimento

Em uma câmara escura, expõe-se a placa de ágar com o microrganismo à luz LW-UV. Observa-se as colônias desenvolvem uma fluorescência vermelha. Caso não ocorra fluorescência, deve-se realizar 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 UW-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 supostamente identificadas como pertencentes ao grupo das *P. intermedia/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 fluorescerem 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.

## b) Teste MUG

O teste do MUG é conveniente para distinguir *Prevotella intermedia/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 crescido sobre uma placa de Ágar que fluorescem de vermelho sob a luz LW-UV são testadas com 4-methylumbelliferyl 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-methylumbelliferone. Este é um composto com uma fluorescência brilhante sob a luz LW-UV.

### 1)Espécimes

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

### 2)Reagentes/Suprimentos

4-Methylumbelliferyl-B-D-galactoside (Sigma-Aldrich, USA)

Lâmpada Ultra-Violeta, Modelo UVL-56, comprimento de onda U.V. – 366nm

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA).

### 3) 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*.

### c) 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.

#### 1) Espécimes

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

#### 2) Reagentes/Suprimentos

Lâmpada Ultra-Violeta, Modelo UVL-56, comprimento de onda U.V. – 366nm

Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, USA).

Tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0

CAAM (7-(N-carbobenoxo-gly-cylglycylargininamido)-4-methyl coumarin.HCl) (Sigma-Aldrich, USA).

### 3) 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.

Colônias pigmentadas de negro que não fluorescem de vermelho sob a luz LW-UV e formam uma fluorescência azul brilhante quando reagem com o CAAM podem ser (supostamente) identificadas como *P. gingivalis*.

## ANEXO 7- Aspectos clínicos, radiográficos e microbiológicos dos 60 pacientes

TABELA13

Aspectos clínicos e radiográficos dos 60 pacientes com canais radiculares associados a abscessos periapicais.

P	SX/ID	D	DOR	HD	DPA	DP	TE	NEC	OD	H	RES	CAR	AB	ED	LES	EXS	FIS	MO	ABS
1	F/34	32	S	N	N	N	N	S	S	N	DEF	N	N	N	S	P	S	N	FZ
2	M/42	45	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	N	C	N	N	SMD
3	M/47	45	S	N	N	S	N	S	S	N	PRO	N	N	N	N	P	N	N	F
4	F/19	26	N	S	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	P	S	N	FZ
5	F/33	15	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	N	S	H	N	N	SP
6	F/39	12	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	P	N	N	SML
7	F/53	11	S	S	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	N	Se	N	N	SMD
8	F/19	36	S	N	S	S	N	S	S	Nn	DEF	N	N	S	N	Se	N	S	SP
9	M/13	46	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	S	P	N	N	SMD
10	F/39	41	N	S	N	S	N	S	S	N	PRO	N	N	N	S	H/P	S	S	FZ
11	M/53	48	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	Se	N	N	SMD
12	M/30	15	S	N	S	S	S	N	S	N	DEF	N	N	S	S	P	N	N	SMD
13	M/30	22	S	N	S	S	N	S	S	N	PRO	S	N	S	S	P	N	N	SP
14	F/39	44	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	S	P	N	N	SMD
15	F/23	21	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	S	P	N	S	SML
16	M/11	46	S	S	S	S	N	S	S	N	PRO	N	N	S	S	Se	N	N	SMD
17	M/16	21	N	S	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	S	P	N	S	SML
18	F/19	12	N	S	N	N	N	S	N	N	DEF	N	N	S	S	P	S	N	FZ
19	M/21	23	S	S	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	N	Se	N	N	SMD
20	F/14	26	S	N	S	S	N	S	S	S	A	N	N	S	N	P	N	N	SMD
21	M/16	41	S	N	S	N	N	S	N	N	DEF	N	N	S	S	P	S	N	FZ
22	F/24	35	S	N	S	N	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	H	N	S	SMD
23	M/39	14	S	N	N	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	N	Se	N	N	SP
24	F/40	46	S	N	S	S	N	S	N	N	A	N	S	S	S	Se	N	N	SMD
25	F/19	45	N	S	S	S	N	S	S	S	A	N	N	S	S	S	N	N	SML
26	F/15	46	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	H/P	N	N	SMD
27	M/31	21	S	N	S	S	N	S	N	N	DEF	N	N	N	S	Se	N	N	SP
28	M/35	11	S	N	S	S	N	S	S	N	PRO	N	N	S	S	Se	N	N	SMD
29	F/36	22	N	N	N	N	S	N	N	N	PRO	N	N	N	S	Se	S	N	FZ
30	F/29	45	S	N	N	S	S	N	N	N	A	N	S	N	S	P	N	S	F

S=sim; N=não

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

Continuação

P	SX/ID	D	DOR	HD	DPA	DP	TE	NEC	OD	H	RES	CAR	AB	ED	LES	EXS	FIS	MO	ABS
31	F/21	11	S	N	S	S	N	S	S	S	A	N	N	S	S	P	N	S	SMD
32	F/59	25	N	S	S	S	S	N	S	N	A	N	S	N	N	Se	S	N	FZ
33	M/44	23	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	S	P	N	S	SML
34	F/24	31	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	Se	N	S	SMD
35	F/24	41	S	N	S	S	N	S	S	N	A	N	S	S	N	P	N	S	SMD
36	F/63	34	S	N	S	S	N	S	S	N	A	N	S	N	S	C	N	S	SML
37	F/63	34	S	N	S	S	N	S	S	N	A	N	S	N	S	C	N	S	SML
38	M/17	21	S	N	S	S	N	S	S	N	A	N	S	N	S	Se	S	N	FZ
39	F/46	13	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	N	C	N	N	SMD
40	M/31	15	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	N	S	P	N	N	SP
41	M/17	24	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	S	P	N	N	SMD
42	F/29	11	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	C	S	N	FZ
43	F/24	21	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	S	C	N	N	SMD
44	M/41	34	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	S	Se	N	N	SMD
45	M/29	12	S	S	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	N	P	N	N	SMD
46	M/17	21	S	N	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	N	P	N	S	SMD
47	M/29	11	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	H/P	N	S	SMD
48	M/40	12	S	S	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	P	N	S	SMD
49	F/20	11	S	S	S	S	N	S	S	N	PRO	N	N	S	S	P	N	S	SP
50	F/20	12	S	S	S	S	N	S	S	N	PRO	N	N	S	S	C	N	N	SP
51	M/35	22	S	N	S	S	N	S	N	N	DEF	N	N	S	S	P	N	S	SMD
52	M/35	21	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	N	C	N	S	SMD
53	M/42	43	S	N	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	N	P	N	N	SMD
54	F/42	45	S	N	S	S	N	S	S	N	A	N	S	S	N	P	N	N	SP
55	M/24	26	S	N	S	N	N	S	S	N	A	S	N	S	N	C	N	N	SMD
56	F/24	24	S	S	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	N	S	P	S	N	FZ
57	F/30	22	N	S	N	N	N	S	S	N	DEF	N	N	N	S	P	N	N	SML
58	M/28	12	S	S	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	P	N	N	SMD
59	F/27	22	S	S	S	S	N	S	S	N	DEF	N	N	S	S	P	N	N	SMD
60	M/41	22	S	S	S	S	N	S	S	N	A	S	N	S	N	P	N	N	SMD

TABELA14

Achados microbiológicos dos 60 pacientes com canais radiculares associados a abscessos periapicais e a localização clínica dos respectivos abscessos encontrados.

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

\*P=paciente; Abs=abscesso, SP= Subperiósteo, SMD=Submucoso difuso, SML=submucoso localizado, FZ=fistulização, F=fênix

Continuação.

P*	Abs	Microrganismos
31	SMD	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i>
32	FZ	<i>Streptococcus constellatus</i>
33	SML	<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella oralis</i> , <i>Prevotella corporis</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Clostridium novyiA</i> , <i>Clostridium cratidioforme</i> , <i>Prevotella</i> spp.
34	SMD	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus constellatus</i>
35	SMD	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella oris</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Gemella morbillorum</i>
36	SML	<i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Micrococcus</i> spp., <i>Streptococcus oralis</i>
37	SML	<i>Streptococcus oralis</i> , <i>Actinomyces odontolyticus</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i>
38	FZ	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Clostridium hastiforme</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
39	SMD	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Clostridium limosum</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Neisseria</i> spp., <i>Peptostreptococcus</i> spp.
40	SP	<i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Clostridium innocuum</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
41	SMD	<i>Prevotella corporis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Wolinella</i> spp., <i>Peptostreptococcus anaerobius</i> , <i>Staphylococcus lentus</i>
42	FZ	<i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Staphylococcus saccharolyticus</i>
43	SMD	<i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Prevotella bivia</i> , <i>Tissierella praeacuta</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i> , <i>Streptococcus sanguis</i>
44	SMD	<i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Veillonella</i> spp., <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>
45	SMD	<i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Veillonella</i> spp., <i>Streptococcus sanguis</i>
46	SMD	<i>Streptococcus constellatus</i> , <i>Bacteroides ureolyticus</i> , <i>Actinomyces viscosus</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
47	SMD	<i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Streptococcus sanguis</i>
48	SMD	<i>Gemella morbillorum</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Prevotella buccae</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i>
49	SP	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Peptostreptococcus magnus</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Peptostreptococcus indolicus</i> , <i>Clostridium difficile</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Bacteroides ureolyticus</i> , <i>Streptococcus salivaris</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i> , <i>Prevotella loescheii</i>
50	SP	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Streptococcus oralis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Prevotella melaninogenica</i>
51	SMD	<i>Streptococcus mitis</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Prevotella intermedia</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Bacteroides ureolyticus</i>
52	SMD	<i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i> , <i>Actinomyces viscosus</i>
53	SMD	<i>Streptococcus sanguis</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Prevotella intermedia</i> <i>Prevotella corporis</i> , <i>Peptostreptococcus prevotii</i>
54	SP	<i>Clostridium bif fermentans</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Bacteroides ureolyticus</i> , <i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Clostridium difficile</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>
55	SMD	<i>Gemella morbillorum</i> , <i>Gemella haemolysans</i> , <i>Streptococcus acidominus</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Fusobacterium nucleatum</i> , <i>Peptostreptococcus micros</i>
56	FZ	<i>Prevotella intermedia</i> , <i>Prevotella oralis</i> , <i>Prevotella buccae</i> , <i>Eubacterium lentum</i> , <i>Eubacterium limosum</i> , <i>Clostridium difficile</i>

Continuação

P*	Abs	Microrganismos
57	SML	<i>Propionibacterium acnes, Fusobacterium necrophorum, Enterococcus faecalis</i>
58	SMD	<i>Prevotella buccae, Peptostreptococcus micros, Fusobacterium nucleatum</i>
		<i>Bifidobacterium adolescentis, Streptococcus anginosus, Gemella morbillorum</i>
59	SMD	<i>Eubacterium lentum, Bacteroides fragilis, Veillonella spp., Streptococcus mitis,</i>
		<i>Tissierella praeacuta</i>
60	SMD	<i>Peptostreptococcus prevotii, Peptostreptococcus anaerobius, Eubacterium lentum, Prevotella buccae,</i>
		<i>Prevotella intermedia, Bacteroides ureolyticus, Streptococcus constellatus,</i>
		<i>Veillonella spp., Fusobacterium necrophorum</i>