

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

BACTERIOLOGIA DAS PERIAPICOPATIAS AGUDAS

Luisi, Simone Bonato
Bacteriologia das periapicopatias agudas / Simone Bonato Luisi ; Orientação
de Elaine Vianna Freitas Fachin ; Co-orientação de Adelina Mezzari. - Porto
Alegre, 1999

Simone Bonato Luisi

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Faculdade de Odontologia. Curso de Mestrado em Clínica Odontológica -
Endodontia.

DISSERTAÇÃO APRESENTADA COMO PARTE DOS
REQUISITOS OBRIGATÓRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
MESTRE EM ODONTOLOGIA, NA ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
CLÍNICA ODONTOLÓGICA/ ENDODONTIA

Profa. Dra. Elaine Vianna Freitas Fachin

Orientadora

Profa. Adelina Mezzari

Co-Orientadora

Porto Alegre (RS), setembro de 1999.

Acredite firmemente

No seu gênio criador,

Na força ativa da mente,

Nas maravilhas do amor...

Quem recebe de nascença

Uma cabeça que pensa,

Um coração para amar...

É feliz a vida toda

Tem riqueza garantida,

Tem tudo o que desejar.

Dinamor

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Valquíria e Milton por terem sido meus primeiros mestres.

Ao Paulo, em quem me encontro e a quem eu amo muito.

E a todos os meus familiares e amigos que se orgulham do meu trabalho, em especial às minhas avós Ponciana, Júlia e Edelvira.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dotado de saúde, inteligência e livre arbítrio.

À professora Doutora e amiga Elaine Vianna Freitas Fachin, por confiar a mim a ilustre tarefa de ser sua primeira orientanda, pelo seu precioso tempo, pelo seu interesse, atenção e constante incentivo para a realização deste sonho.

À professora Adelina Mezzari que gentilmente se dispôs a colaborar, sendo um exemplo de dedicação à causa do ensino e pesquisa.

Aos professores Nicolau Fonseca Milano, Régis Burmeister dos Santos e João Ferlini Filho, pelo apoio, incentivo e sobretudo pela amizade, os quais tornaram possível a realização deste projeto.

Ao laboratório Weinmann, em especial à pessoa do Dr. Júlio Diehl, pela acolhida e apoio na materialização da parte experimental deste trabalho.

Ao professor Dr. Afonso Barth por ter contribuído muito com a sua experiência em estudos microbiológicos.

À colega Maristela Gutiérrez de Borba, amiga e companheira na caminhada desta conquista.

À colega Daniela Benites Rosito, exemplo de cirurgiã-dentista, sempre tão disposta e solícita.

À professora Marybel Rivero que acompanhou a trajetória deste projeto desde o seu início, auxiliando-me com a língua inglesa.

À Elaine Maria Zanchin Alice que, com desprendimento e presteza, realizou a revisão do Português.

Às bibliotecárias Eloisa Futuro Pfitscher e Norma Beatriz Loureiro da Faculdade de Odontologia da UFRGS, pelas colaborações prestadas.

E a todos que, de uma forma ou de outra, auxiliaram na concretização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

RESUMO

O conhecimento mais aprofundado sobre a microbiologia endodôntica é um recurso fundamental para entender o papel das bactérias na origem e desenvolvimento dos processos patológicos apicais, bem como oferecer subsídios para a instituição de uma terapêutica adequada. Trata-se de trabalho *in vivo* com o propósito de investigar a composição bacteriana das periapicopatias agudas, identificando os microrganismos encontrados nos canais radiculares de 11 dentes necróticos de 11 pacientes. O resultado da cultura bacteriológica para aeróbios e anaeróbios foi negativo em cinco dentes. Em uma amostra foram identificados dois microrganismos (*Staphylococcus* sp. coagulase negativo e *Peptostreptococcus* sp.). *Peptostreptococcus* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus* sp. grupo viridans foram obtidos como cultura pura nos outros cinco dentes. Nesse estudo foi possível identificar algumas bactérias potencialmente patogênicas em periapicopatias agudas, tais como *Peptostreptococcus* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus* sp. grupo viridans e *Enterococcus faecalis*. No entanto, a técnica empregada pode não ter sido adequada para determinar a composição bacteriana específica das periapicopatias agudas, considerando que não houve crescimento bacteriano em quase metade das amostras, que bactérias anaeróbias foram isoladas em apenas três dos 11 casos e que culturas mistas foram identificadas em apenas uma das amostras.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Ilustração de uma periapicopatia aguda, no dente 11, com a presença nítida de edema na região periapical..... | 45 |
| Figura 2 - Radiografia periapical pré-operatória do dente 11, portador de um processo periapical crônico em fase aguda..... | 46 |
| Figura 3 - Procedimento de desinfecção com iodo-etanol 5%..... | 48 |
| Figura 4 - Procedimento de desinfecção com etanol 70%..... | 48 |
| Figura 5 - Técnica da coleta de material para a realização do exame microbiológico dos canais radiculares..... | 50 |
| Figura 6 - Cone de papel no interior do canal radicular para a coleta do material..... | 51 |
| Figura 7 - Tubos com tampa rosca contendo tioglicolato..... | 51 |
| Figura 8 - Esquema de semeadura para cultura de aeróbios e anaeróbios..... | 53 |
| Figura 9 - Jarra anaeróbia de resina plástica transparente (BBL) e sistema químico Probac..... | 56 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Ordenação dos pacientes examinados e dos resultados obtidos | 63 |
| Tabela 2 - Ocorrência dos grupos bacterianos nos casos de cultura positiva..... | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------|---|
| (-) | negativo |
| (+) | positivo |
| ++ | fortemente positivo |
| (100X) | cem vezes de aumento |
| 1:1 | um para um |
| BBE | Bacteróides Bile Esculina |
| BBL | nome comercial |
| BEM | agar bile esculina |
| CAMP | <i>Lytic factor named after Christie, Atkins and Munch-Peterson</i> |
| CI | carteira de identidade |
| cm | centímetro |
| CM | carne picada |
| CO ₂ | dióxido de carbono |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FIG. | figura |
| g | grama |
| g/litro | grama por litro |
| H ₂ | hidrogênio |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrogênio |
| HCl | ácido clorídrico |
| Ig G | imunoglobulina G |

| | |
|--------------------|--|
| K Hemina | vitamina K e hemina |
| KV | kanamicina - vancomicina |
| l | litro |
| Ltd. | limitada |
| mg/l | miligrama por litro |
| mg/ml | miligrama por mililitro |
| Mich. | Michigan |
| minuto/ml | minuto por mililitro |
| ml | mililitro |
| ml/l | mililitro por litro |
| mm | milímetro |
| mod. | modificado |
| N ₂ | nitrogênio |
| NaCl | cloreto de sódio |
| NaHCO ₃ | bicarbonato de sódio |
| NaOH N | hidróxido de sódio - 1 normal |
| n° | número |
| PRAS | pré-reduzido esterilizado anaerobicamente |
| PY | levedura peptona |
| PYG | levedura glicose peptona |
| RTF | fluido de transporte reduzido |
| SF | púrpura de bromocresol azida (meio ou caldo) |
| sp. | espécie |

| | |
|-------|--|
| spp. | espécies |
| ssp. | subespécie |
| TR | tipo respiratório |
| ug | micrograma |
| ug/ml | micrograma por mililitro |
| v/v | volume volume |
| VB - | verde brilhante negativo |
| VB + | verde brilhante positivo |
| VMGA | <i>Viability Maintaining Microbiostatic Medium</i> |
| VPI | Instituto Politécnico da Virgínia |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| DEDICATÓRIA..... | III |
| AGRADECIMENTOS..... | IV |
| RESUMO..... | VI |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | VII |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | VIII |
| LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS..... | IX |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA..... | 04 |
| 2.1. ASSINTOMÁTICOS..... | 04 |
| 2.2. SINTOMÁTICOS..... | 21 |
| 3. PROPOSIÇÃO..... | 44 |
| 4. MATERIAL E MÉTODO..... | 45 |
| 4.1. COLETA DO MATERIAL..... | 47 |
| 4.2. CULTURA MICROBIOLÓGICA..... | 52 |
| 4.2.1. Pesquisa de bactérias aeróbias..... | 54 |
| 4.2.2. Pesquisa de bactérias anaeróbias..... | 55 |
| 5. RESULTADOS..... | 58 |
| 6. DISCUSSÃO..... | 66 |
| 7. CONCLUSÕES..... | 93 |
| SUMMARY..... | 94 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 95 |

ANEXOS:

Anexo 1 - Ficha clínica

Anexo 2 - Termo de Consentimento

Anexo 3 - Termo de Aprovação na Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da UFRGS.

Anexo 4 - Requisição de solicitação de exames

Anexo 5 - Identificação de cocos aeróbios

Anexo 6 - Identificação de anaeróbios

Anexo 7 - Meios de cultura

Anexo 8 - Resultado dos exames microbiológicos

1. INTRODUÇÃO:

As alterações periapicais agudas exigem um tratamento imediato e eficiente. Dependendo do estágio em que o processo periapical agudo se encontra, o quadro clínico pode ser de intensa sintomatologia dolorosa, incluindo, até mesmo, o comprometimento sistêmico do indivíduo.

As periapicopatias agudas podem ser consequência da ação direta de agentes microbianos ou da ação de agentes físicos, químicos ou traumáticos que causam alterações inflamatórias irreversíveis na polpa dentária facilitando a instalação de posterior infecção. Dessa forma, considera-se o componente bacteriano o principal responsável pela patogênese dos processos periapicais. Existem outras alterações patológicas periapicais que não mantêm relações diretas com a polpa (de natureza neoplásica, metabólica, hiperplásica), porém não constituem objetivo do presente estudo.

O relevante papel bacteriano foi demonstrado há mais de um século, quando em 1890, MILLER evidenciou a presença de bactérias no canal radicular. Desde então, vários estudos têm demonstrado o importante papel da bactéria na patogênese das alterações endodônticas periapicais (WINKLER; VAN AMEROGEN (1959), CARLSSON; FRÖLANDER; SUNDQVIST (1977), SUNDQVIST et al. (1979), ZAVISTOSKI et al. (1980), GRIFFEE et al. (1980), BROOK; GRIM; KIELICH (1981), LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983), NAIR (1987), YOSHIDA et al. (1987), FUKUSHIMA et al. (1990), SUNDQVIST (1992), HASHIOKA et al. (1992), PETERS; WESSELINK; MOORER (1995), SIQUEIRA; UZEDA; FONSECA (1996) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a)).

Tanto é assim que em 1957 MacDONALD; HARE; WOOD, investigando o estado bacteriológico de câmaras pulpares de 46 dentes traumatizados com a coroa intacta e necrose pulpar, obtiveram o crescimento bacteriano em 38 dentes.

KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD (1965), em um estudo clássico, expuseram a polpa dental de ratos *non germ-free* e de ratos *germ-free* ao meio bucal, o que resultou no desenvolvimento de inflamação crônica e finalmente granulomas periapicais nos *non germ-free*. Por outro lado, em um ambiente livre de germes, a resposta dos tecidos pulpares expostos foi caracterizada por uma inflamação mínima e a formação de pontes de dentina, evidenciando o papel fundamental das bactérias no desenvolvimento das lesões periapicais.

Em 1976, SUNDQVIST investigou microrganismos presentes nos canais radiculares de dentes com polpas necróticas seguidas de trauma, e também constatou a presença dos microrganismos, corroborando o estudo anterior de MacDONALD; HARE; WOOD (1957). Foi o primeiro autor a demonstrar uma aparente relação de causa e efeito entre microrganismos específicos e sintomas associados com patologias periapicais agudas, apud GRIFFEE et al. (1980).

Até 1970, em verdade, os estudos do ecossistema microbiano do canal radicular de dentes despulpados e infectados mostravam predominância de microrganismos aeróbios, sendo que as referências a anaeróbios estritos eram escassas em razão das dificuldades de isolamento dessas bactérias (HEAD; ROOS (1919), MacDONALD; HARE; WOOD (1957), WINKLER; VAN AMEROGEN (1959) e GOLDBERG (1970)). Entretanto, com o advento dos métodos práticos para a cultura anaeróbia, tornou-se evidente, através de diversos estudos, (BROOK; GRIM; KIELICH (1981), YOSHIDA et al. (1987), FUKUSHIMA et al.

(1990), SUNDQVIST (1992), HASHIOKA et al. (1992) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a)) que há uma elevada prevalência de anaeróbios nos canais radiculares necróticos.

Mais recentemente, BAUMGARTNER (1997) cita que das mais de 350 espécies de bactérias reconhecidas como microbiota bucal normal, apenas um grupo relativamente pequeno é isolado das cavidades pulpares infectadas. E, nas bactérias isoladas, há um predomínio de anaeróbios estritos, seguidos por anaeróbios facultativos e raramente são encontrados microrganismos aeróbios. Isso ocorre pois o canal radicular representa um ambiente especial, no qual pressões seletivas, demandas nutricionais e inter-relações microbianas permitem o estabelecimento de um grupo restrito da microbiota bucal.

Apesar da terapia endodôntica contemporânea atingir altos níveis de sucesso clínico, ainda existem casos resistentes às manobras convencionais, especialmente em relação ao tratamento das patologias endodônticas agudas, comumente necessitando de métodos alternativos com o uso de antimicrobianos específicos. Pairem-se ainda dúvidas no que se refere à etiologia e à resolução de tais complicações.

Embora tenha sido isolada uma variação de espécies bacterianas de canais radiculares infectados, há diferenças na frequência de isolamento das espécies microbianas entre os diferentes estudos. Isto pode estar relacionado a um grande número de variáveis, incluindo a técnica de coleta de amostras, o meio de transporte, o meio de cultura, o tipo de incubação e o método de identificação.

A busca de resultados mais conclusivos fundamenta o estudo do presente assunto, no intuito de esclarecer questões relacionadas a etiologia dos processos periapicais agudos e oferecer maiores subsídios para a instituição de uma terapêutica mais adequada.

2. REVISÃO DE LITERATURA:

Com o objetivo de organizar e facilitar o entendimento do presente tema, decidiu-se dividir a revisão de literatura em dois segmentos: trabalhos enfocando a microbiologia endodôntica de casos assintomáticos e trabalhos relacionados com a microbiologia de patologias endodônticas sintomáticas.

2.1. ASSINTOMÁTICOS:

Em 1966, MÖLLER, apud GRIFFEE et al. (1980), revelou que a infecção do canal radicular é usualmente polimicrobiana, onde os anaeróbios são dominantes. Isso foi constatado na sua tese intitulada Exame Microbiológico dos Canais Radiculares e Tecidos Periapicais de Dentes Humanos. A partir da metodologia usada neste trabalho, uma série de experimentos foram desenvolvidos para o estudo da microbiota dos canais radiculares. Os autores GRIFFEE et al. (1980), SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989) e HAAPASALO (1989) realizaram suas pesquisas adotando a técnica de desinfecção prévia à amostragem microbiológica do canal radicular utilizada por MÖLLER (1966), que dita: "... após o isolamento do dente com lençol de borracha, o dente, o grampo e as superfícies vizinhas foram desinfetadas com H₂O₂ 30% de um a dois minutos. Após a abertura de 1 a 2mm em dentina ou restauração (definitiva ou provisória), com o uso de brocas em alta rotação, o dente foi novamente desinfetado com H₂O₂ por 10 a 15 segundos, seguido de uma aplicação de tintura de iodo 2% durante um a dois minutos. O iodo foi desativado com tiosulfato de sódio 5% e a abertura foi finalizada com o uso de brocas em baixa rotação..." apud GRIFFEE et al. (1980). Além disso, a técnica de amostragem usada por Möller (1966) e por Sundqvist (1976) na sua dissertação foi adotada por GRIFFEE et al. (1980). Esta técnica de amostragem dita: "... uma pequena quantidade de caldo pré-reduzido de carne picada (CM) foi colocado na câmara pulpar aberta. Com o caldo em seu interior, o dente foi

radiografado para a determinação do comprimento do canal radicular. Uma ponta de papel absorvente estéril foi introduzida no interior do canal radicular dos dentes monorradiculares ou no canal mais amplo dos polirradiculares. A ponta de papel foi esfregada sobre uma placa de agar Schaedler reduzido. A placa foi colocada em atmosfera de H₂ e CO₂ (Bio-Bag) e incubada a 37°C por sete dias. Uma segunda ponta de papel foi similarmente inserida no canal radicular e após colocada dentro de um tubo com tampa rosca contendo no mínimo 60% de caldo de tioglicolato pré-reduzido. O tubo foi incubado aerobicamente, com a tampa bem fechada a 37°C, por sete dias ou até o crescimento ser visível. Os meios de cultura usados foram: a) carne picada (CM); b) tioglicolato fluido com 0,75% de agar e 0,0001% de indicador resazurina; c) agar Schaedler K-V com 5% de sangue de carneiro. Todos os meios foram mantidos em uma atmosfera de nitrogênio por, no mínimo, 24 horas antes do uso...” apud GRIFFEE et al. (1980).

KANTZ; HENRY (1974) examinaram 24 dentes de 20 pacientes com o objetivo de isolar e identificar anaeróbios estritos de dentes infectados com necrose pulpar e câmara pulpar intacta. Para todos os dentes os autores seguiram a mesma rotina: o dente foi isolado da cavidade bucal com lençol de borracha e desinfetado com mercocresol. Gás de nitrogênio foi direcionado nas superfícies do dente, enquanto a câmara pulpar era aberta. Uma seringa com agulha foi usada para remover 0,1ml de RTF (fluido de transporte reduzido) de um tubo fechado. O RTF foi colocado no interior da câmara pulpar, seguido por uma instrumentação com lima Hedstrom. Um décimo de mililitro foi aspirado pela seringa e o conteúdo foi então injetado de volta para o tubo com RTF original. Neste momento, o gás de nitrogênio foi removido e uma ponta de papel foi introduzida no interior do canal e permaneceu por 60 segundos nesta posição. A ponta foi colocada em um caldo

de tioglicolato (Difco). O tioglicolato foi incubado a 35°C aerobicamente por 10 dias. O tubo com RTF foi prontamente colocado em uma câmara de anaerobiose para o processamento. Os anaeróbios foram isolados exclusivamente em três das 24 amostras. Microrganismos facultativos foram isolados exclusivamente em quatro das 24 amostras. Em nove das 24 amostras foram encontradas culturas mistas com anaeróbios e microrganismos facultativos. Os anaeróbios foram encontrados em 54% de todos os casos e os facultativos em 22,5% dos casos.

BERGENHOLTZ, também em 1974, realizou um estudo objetivando investigar a ocorrência de bactérias em 84 dentes traumatizados desvitalizados com a câmara pulpar intacta de 65 pacientes. A amostragem foi feita com uma ponta de papel estéril que foi inserida no canal radicular. Dos 84 espécimes analisados, 54 (64%) obtiveram crescimento bacteriano. A flora dominante do canal radicular foi composta por *Bacteroides*, *Corynebacterium*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium*. Segundo o autor, a composição da microflora não variou com o tipo de trauma que o dente sofreu e nem com a aparência clínica da coroa. A maioria dos dentes com fratura da coroa com exposição de dentina, dentes que sofreram luxação, dentes com destruição periapical evidente e dentes com reabsorção externa lateral tiveram altas freqüências de crescimento bacteriano.

KEUDELL et al. (1976) realizaram um experimento com o propósito de isolar e identificar microrganismos de câmaras pulpares de dentes que necessitavam de terapia endodôntica. Particular ênfase foi dada ao isolamento de anaeróbios obrigatórios, usando técnicas do laboratório de anaerobiose do Instituto Politécnico da Virgínia (VPI). Um total de 55 dentes vitais e necróticos foram amostrados. Não houve crescimento bacteriano em

três dentes vitais e em nove dentes necróticos. Os anaeróbios não foram encontrados nas câmaras pulpares de dentes vitais. Um ou mais anaeróbios foram encontrados em 64% das câmaras pulpares com polpas necróticas e infectadas. A maioria dos anaeróbios isolados compreendem bacilos Gram-positivos e Gram-negativos. Entre os aeróbios isolados, os estreptococos foram os mais freqüentes seguidos pelos bacilos Gram-positivos catalase-negativo, *Staphylococcus epidermidis*, bacilos Gram-positivos catalase positivo e *Staphylococcus aureus*.

Em 1977, GOODMAN realizou um experimento com o propósito de desenvolver clinicamente uma técnica prática para o isolamento de microrganismos anaeróbios predominantes no sistema de canais radiculares de dentes necróticos e coroas intactas. Nesse estudo foi testado o uso de uma solução de transporte para o material amostrado. Todos os 55 dentes estudados estavam necróticos. Cada dente foi individualmente isolado da cavidade bucal com lençol de borracha. O campo foi desinfetado inicialmente com Betadine, após, com álcool isopropil. Um total de cinco pontas de papel pré-empacotadas e pré-esterilizadas foram utilizadas para a amostra do exsudato do sistema de canal radicular. As amostras foram imediatamente colocadas dentro de uma solução de transporte (Stuart) e enviada ao laboratório. O tempo entre a amostragem e o recebimento do espécime pelo laboratório foi sempre inferior a oito horas. No laboratório, as pontas de papel foram manipuladas com um aplicador estéril e plaqueadas em agar sangue, agar chocolate, agar sangue neomicina, caldo de tioglicolato e incubados a 35°C por 24 horas. Uma placa adicional de agar sangue foi incubada anaerobicamente em uma jarra de anaerobiose por 48 horas a 35°C. Houve crescimento bacteriano nos 55 dentes amostrados. Em 18 casos houve o crescimento apenas de bactérias anaeróbias (destes, cinco casos eram culturas com apenas

um anaeróbio) e nos outros 37 casos havia infecções mistas com ambas bactérias: aeróbias e anaeróbias. Em todos os casos havia, no mínimo um anaeróbio. Mais da metade do número de organismos isolados eram anaeróbios e quase metade desses eram Gram-negativos. Os autores demonstraram que as infecções mais frequentemente envolvem uma mistura de bactérias aeróbias e anaeróbias em oposição a culturas puras. O autor concluiu que essa técnica foi capaz de isolar e identificar o mesmo espectro predominante de bactérias anaeróbias relatado por estudos de outros autores que utilizaram a rígida técnica do Instituto Politécnico da Virgínia (VPI).

Em 1980, CARLSSON; SUNDQVIST avaliaram cinco métodos de transporte e cultivo de espécimes bacterianos de canais radiculares infectados. a) Método 1: Os espécimes em pontas de papel tratadas com carvão foram transportados ao laboratório em 5ml de um meio de transporte e foram processados cuidadosamente no laboratório dentro de seis horas após a coleção. b) Método 2: Os espécimes em pontas de papel tratadas com carvão foram colocados dentro de um tubo com 5ml de PRAS caldo de soja tripticaseína (Oxoid CM 129) suplementado com cisteína HCL (0,5mg/ml) e resazurina (1ug/ml). Para evitar a oxidação do meio PRAS, o tubo foi borrifado com gás livre de oxigênio (97% de CO₂ e 3% de H₂). Os espécimes foram então transportados para o laboratório em tubos bem vedados. c) Método 3: Os espécimes foram transportados para o laboratório da mesma forma que no método 1. Os frascos para o transporte foram conduzidos em um *anaerobic box* com uma atmosfera de 10% de H₂ e 5% de CO₂ em nitrogênio. Uma ponta de papel foi tomada do frasco de transporte e rolada sobre a superfície de uma placa de agar sangue. A placa de agar sangue foi incubada por quatro dias a 37°C no *anaerobic box*. d) Método 4: Os espécimes foram transportados em um meio líquido de tioglicolato USP (11260, BBL)

suplementado com agar (1,5 mg/ml; N.º 1, L11, Oxoid). Esse meio foi colocado em um frasco com tampa rosca (50 por 16,25mm., Labora AB, Stockholm) e autoclavado por 20 minutos a 121°C. No laboratório, os frascos foram colocados dentro de um *anaerobic box* e os espécimes foram tratados e caracterizados como descrito no método 3. Cada frasco de transporte continha usualmente três pontas de papel e as pontas não foram usadas para a cultura inicial em agar sangue e sim foram incubadas em tioglicolato a 37°C por 14 dias. e)

Método 5: Os espécimes foram transportados no meio fluido de tioglicolato ou no meio Clausem (CM 353, Oxoid). Esses meios foram suplementados com agar (1,5mg/ml). Bactérias foram isoladas em 29% dos espécimes quando eles foram transportados em um meio de transporte e cultivados em meio PRAS ou em superfície de agar sangue, em um *anaerobic box*. Quando um caldo de levedura peptona PRAS foi usado para o transporte e os espécimes foram inicialmente cultivados em caldo, bactérias foram encontradas em 49% dos espécimes. Quando um meio fluido de tioglicolato USP (BBL) e meio Clausen (Oxoid) foram usados para o transporte, bem como para a cultura inicial, bactérias foram encontradas em 58% e 47% dos espécimes respectivamente. A recuperação de bactérias pelo meio fluido de tioglicolato foi bom ou até melhor quando comparado com o elaborado meio PRAS. O meio fluido de tioglicolato USP em um tubo com tampa rosca não exige qualquer equipamento especial na clínica dentária e é recomendado para uso rotineiro na prática dentária.

BYSTRÖN; SUNDQVIST (1981) avaliaram, bacteriologicamente, a eficácia dos mecanismos de instrumentação do canal radicular na terapia endodôntica. Para tanto, os autores fizeram inicialmente uma primeira amostragem do canal radicular de 15 dentes monorradiculares com polpas necróticas e com as paredes das câmaras pulparentes intactas (10

dentes com a coroa intacta e cinco com pequenas restaurações). Após a completa instrumentação, foram realizadas outras amostragens. As bactérias foram encontradas em todos os espécimes da amostragem inicial. Os microrganismos mais comumente isolados foram: *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobios*, *Fusobacterium nucleatum*, *Bacteroides oralis*, *Bacteroides melaninogenicus* subespécie *intermedius* e *Eubacterium alactolyticum*.

FABRICIUS et al. (1982) desvitalizaram mecanicamente 24 canais radiculares de três macacos. Os canais permaneceram expostos à flora bucal por uma semana e depois foram selados. A amostragem microbiológica e análise foi realizada em 16 dentes após sete dias de fechados (amostra inicial). Observações foram feitas nos três macacos após 90, 180 e 1060 dias. A amostragem final incluiu amostras do canal radicular principal, dentina e região apical, na mesma sessão de amostragem. Os autores concluíram que algumas bactérias orais indígenas são capazes de induzir periodontites apicais sendo que combinações de bactérias são ainda mais nocivas do que cepas únicas. E, além disso, as bactérias anaeróbias obrigatórias como *Bacteroides* e alguns bacilos anaeróbios Gram-positivos apresentam um importante papel no desenvolvimento e manutenção de periodontites apicais, enquanto as bactérias anaeróbias facultativas como estreptococos parecem ser de menor importância.

Em 1983, BYSTRÖN; SUNDQVIST avaliaram a efetividade do hipoclorito de sódio (0,5%) comparando com uma solução salina no tratamento de 30 dentes com polpas necróticas e periodontites apicais. Todos os dentes apresentavam destruição óssea periapical constatada radiograficamente. O dente foi isolado da cavidade bucal com lençol de borracha

e a desinfecção das superfícies foi realizada com peróxido de hidrogênio 30%, tintura de iodo 5% e tiosulfato de sódio 5%. A amostragem do conteúdo do interior do canal radicular foi realizada com pontas de papel tratadas com carvão, que foram imediatamente transferidas do canal radicular para um tubo contendo 5ml de caldo de levedura glicose peptona (PYG). O tubo com o espécime foi introduzido em uma câmara de anaerobiose e foi agitado mecanicamente até as pontas de papel se desintegrarem. Após, foram realizadas as inoculações em agar sangue, agar mitis salivarius e meio Rogosa SL. Os meios foram incubados em aerobiose (agar sangue) por 48 horas e em anaerobiose (agar sangue, agar mitis salivarius e meio Rogosa SL) por 10 dias, ambos a 37°C. Bactérias foram encontradas em todas as amostras. Os anaeróbios representavam 88% de todos os grupos bacterianos isolados. As espécies mais comumente isoladas foram: *Fusobacterium nucleatum* (16), *Eubacterium alactolyticum* (10), *Peptostreptococcus anaerobios* (nove), *Peptostreptococcus micros* (nove), *Bacteroides melaninogenicus* subespécie *intermedius* (nove), *Bacteroides oralis* (sete) e *Eubacterium lentum* (sete).

Cabe aqui ressaltar que a taxonomia dos *Bacteroides* pigmentados pela cor preta sofreu muitas mudanças com o passar dos anos. Em 1984, HAAPASALO et al. descreveram que o grupo de *Bacteroides melaninogenicus*, a única espécie dos *Bacteroides* pigmentados por preto, era dividido em três subespécies: ssp. *intermedius* ssp. *melaninogenicus* e ssp. *asaccharoliticus*. A partir daí, diversas bactérias novas foram determinadas e sete diferentes espécies foram incluídas no grupo de *Bacteroides* pigmentados por preto: *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides corporis*, *Bacteroides denticola*, *Bacteroides loesheii*, *Bacteroides melaninogenicus*, *Bacteroides asaccharoliticus* e *Bacteroides gingivalis*.

THILO; BAEHNI; HOLZ (1986) através da microscopia de campo escuro, observaram a distribuição bacteriana nos terços coronário e apical dos canais radiculares de dentes que sofreram necrose pulpar. Após exodontia, 20 dentes monorradiculares de 19 pacientes foram seccionados em três partes iguais. Os resultados demonstraram uma maior porcentagem de cocos e bacilos no terço coronário do que no terço apical. Os autores observaram uma positiva correlação entre a porcentagem de espiroquetas no terço apical e o tamanho da lesão visível radiograficamente.

Em 1988, SHAH; COLLINS relataram que os assacarolíticos, *Bacteroides pigmentados*, *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides endodontalis* formam um grupo relativamente homogêneo de espécies, os quais diferem marcadamente em propriedades bioquímicas e químicas do tipo de espécies dos *Bacteroides*, *Bacteroides fragilis*, tais que eles não deveriam ser integrantes desse gênero. Então, os autores propuseram a reclassificação de *Bacteroides asaccharolitycus*, *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides endodontalis* em um novo gênero, classificando esses microrganismos de *Porphyromonas* (*Porphyromonas asaccharolityca*, *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis*).

PANTERA; ZAMBON; SHIH-LEVINE (1988) compararam a cultura anaeróbia com imunofluorescência indireta na detecção de espécies de *Bacteroides* em canais radiculares. As amostras microbiológicas foram obtidas de 30 dentes humanos frescamente extraídos e também de 82 pacientes durante a terapia endodôntica. Em todas as amostras foram feitas culturas anaeróbias. As colônias de *Bacteroides pigmentados* por preto foram sub-cultivadas e identificadas pelo método de Gram, morfologia celular e colonial, testes

bioquímicos e gás líquido de cromatografia. A presença e proporção de *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* e *Bacteroides endodontalis* foram então determinadas pela imunofluorescência. As culturas anaeróbias demonstraram espécies de *Bacteroides* em 27% das amostras feitas de dentes extraídos e em 20% daqueles pacientes amostrados. Em oposição, o método de imunofluorescência detectou espécies de *Bacteroides* em 86% e 49% das mesmas amostras respectivamente. *Bacteroides intermedius* foram encontrados em 11% dos pacientes amostrados, mas identificados em 43% das mesmas amostras pelo método da imunofluorescência. *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides endodontalis* foram encontrados em 4% e 1% das amostras, respectivamente, mas detectados pelo método da imunofluorescência em 15% e 16% das amostras. *Bacteroides intermedius* foram os *Bacteroides* pigmentados por preto mais freqüentemente encontrados em ambas: cultura anaeróbia e microscopia de imunofluorescência. A sensibilidade dos ensaios de imunofluorescência comparada com cultura anaeróbia foi 100% enquanto a especificidade variou de 64% a 89%. Os autores concluíram que a imunofluorescência indireta pode ser usada para detecção clínica de espécies de *Bacteroides* pigmentados por preto em infecções da polpa dentária e que o *Bacteroides intermedius* é um microrganismo chave dentro da lesão endodôntica.

MOLANDER; REIT; DAHLÉN em 1990 investigaram o efeito da clindamicina como curativo intra-canal de dentes com periodontite apical assintomáticos. Participaram desse experimento 20 dentes com polpas necróticas e radiolucidez periapical. Uma inicial amostragem bacteriológica foi realizada e após um período de 14 e 21 dias foram realizadas outras amostragens para a avaliação do curativo de demora com clindamicina. Antes da entrada à câmara pulpar, os dentes foram isolados com lençol de borracha e um

procedimento de desinfecção foi realizado com peróxido de hidrogênio 30% e tintura de iodo 5%. O iodo foi desativado com tiosulfato de sódio 5%. O acesso a câmara pulpar foi realizado com brocas estéreis. Fluido de amostra (VMGA I, Möller 1966) foi adicionado ao interior do canal e esse foi alargado com o uso de limas ou alargadores. O fluido foi absorvido com porções de carvão conduzidas para dentro do canal e então transferidas para um meio de transporte (VMGA III). Após a diluição, uma alíquota (0,1ml) do meio de transporte foi colocada em duas placas de agar sangue de Brucella enriquecido com sangue hemolisado 50ml/l, hemina 5mg/ml e menadione 0,5ug/ml. Uma das placas foi incubada por sete a oito dias em jarra de anaerobiose contendo 90% de H₂ e 10% de CO₂. A outra placa foi incubada aerobicamente por três a cinco dias. O exame microbiológico inicial revelou microrganismos em 24 dos 25 dentes amostrados. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram: bacilos anaeróbios Gram-positivos (16 cepas, incluindo espécies de *Actinomyces*, *Eubacterium* e *Propionibacterium*), espécies de *Bacteroides* (15 cepas, incluindo três pigmentados por preto), *Streptococcus* do grupo viridans (14 cepas), *Peptostreptococcus* spp. (nove cepas), espécies de *Fusobacterium* (oito cepas), espécies de *Lactobacillus* (sete cepas), *Veillonella* (cinco cepas) e espécies de *Enterococcus* (duas cepas).

FUKUSHIMA et al. (1990) realizaram um estudo em 21 dentes portadores de patologia periapical assintomática. Os dentes foram extraídos para exame da localização e identificação da bactéria no canal radicular. Para cada amostra fez-se a desinfecção com álcool iodado tanto do dente como da gengiva ao seu redor. Após anestesia local, os dentes foram extraídos e imediatamente inseridos em 4,5ml de fluido de transporte reduzido sob uma nuvem de gás anaeróbio (10% de H₂, 10% CO₂ estabilizado com N₂), selados

firmemente e transferidos para o laboratório. Em 60% dos casos os autores encontraram culturas polimicrobianas. Os microrganismos que predominaram foram: *Bacteroides*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* e *Eubacterium*, que também estão presentes nos casos sintomáticos. Esses dados permitiram aos autores concluir que as bactérias, persistindo no ápice radicular das lesões assintomáticas, podem ter um potencial patológico para a progressão de patologias periapicais sintomáticas.

Também em 1992, BAUMGARTNER et al. afirmaram que a maior causa das periodontites apicais é a invasão da bactéria no sistema de canais radiculares e conseqüente reação imunológica do hospedeiro. O propósito do estudo realizado foi comparar os níveis da imunoglobulina G (IgG) reativa com um grupo de 10 microrganismos anaeróbios envolvidos em infecções de origem endodôntica. Os autores também associaram *Porphyromonas intermedia* com ambas as doenças: endodôntica e periodontal crônica de adultos.

SUNDQVIST (1992) investigou as relações (cooperativas e antagonistas) entre microrganismos dos canais radiculares de dentes com periodontite apical. As amostras foram feitas com pontas de papel tratadas com carvão em 65 canais radiculares de dentes humanos infectados, com evidência radiográfica de reabsorção óssea. As espécies mais comumente isoladas foram: *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Peptostreptococcus anaerobios*, *Eubacterium alactolyticum*, *Eubacterium lentum* e *Wolinella recta*. Associações positivas foram encontradas entre *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus micros*; *Porphyromonas endodontalis*, *Selenomonas sputigena* e *Wolinella recta*. Também foi positiva a associação entre *Prevotella intermedia* e *Peptostreptococcus micros*; *Peptostreptococcus anaerobios* e

Eubacterium. Em geral, as espécies de *Streptococcus*, *Propionibacterium propionica*, *Capnocytophaga ochracea* e *Veillonella parvula* não demonstraram ou apresentaram associações negativas com outras bactérias. Os resultados são consistentes no que se refere a existência, no canal radicular, de um ambiente especial e seletivo. Isso devido a natureza cooperativa e antagonista das relações entre bactérias no canal radicular.

A taxonomia, ecologia e patogenicidade da flora do canal radicular foi descrita por SUNDQVIST em 1994. O autor relatou que todas as bactérias que habitam normalmente a cavidade oral, teoricamente, possuem a capacidade de invadir o canal radicular durante e após a necrose pulpar, infectando o canal e finalmente penetrando nos tecidos periapicais. Entretanto, as bactérias presentes em canais radiculares infectados incluem um restrito grupo de espécies quando comparados com a flora total da cavidade bucal. Condições existentes no canal radicular permitem o crescimento de bactérias anaeróbias que são capazes de fermentar aminoácidos e peptídeos, enquanto que bactérias, que principalmente obtém energia através da fermentação de carboidratos, ficam limitadas pela falta de nutriente disponíveis. Durante o curso da infecção, inter-relações se desenvolvem entre espécies microbianas e a população muda com resultado dessas interações. Fortes associações entre certas espécies são presentes. Estas associações são mais provavelmente baseadas nas demandas nutricionais e nas relações nutricionais. A patogenicidade da flora polimicrobiana do canal radicular é dependente do sinergismo bacteriano. O autor ressalta a importância do conhecimento da taxonomia para a interpretação dos resultados de diferentes estudos. Os bacilos anaeróbios Gram-negativos pigmentados por preto são um exemplo disto. Inicialmente todos os bacilos anaeróbios que produziam colônias pigmentadas por preto, quando cresciam em agar sangue, eram classificados em uma

espécie como *Bacteroides melaninogenicus*. Essa espécie foi subseqüentemente dividida, e no presente compreendem oito diferentes espécies de bacilos anaeróbios pigmentados por preto que podem estar presentes em amostras da cavidade bucal. As espécies sacarolíticas pigmentadas por preto foram reclassificadas dentro de um novo gênero *Prevotella* e as espécies de assacarolíticas dentro do novo gênero *Porphyromonas*. O autor isolou mais freqüentemente *Fusobacterium nucleatum* dos canais radiculares necróticos. Esta espécie, cita o autor, foi recentemente sub-dividida em três subespécies: *nucleatum*, *polymorphum* e *vincentii*. Nenhuma identificação a nível de subespécie foi feita em isolados de canais radiculares. *Streptococcus anginosus* (incluindo espécies anteriormente identificadas como *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus intermedius* e *Streptococcus milleri*) e *Streptococcus mitis* foram as espécies de *Streptococcus* mais comumente isoladas. Os *Peptostreptococcus micros* e *Peptostreptococcus anaerobius* foram isolados em mais de um terço dos canais radiculares amostrados e freqüentemente ocorreram juntos. Em resumo, foi destacado que a flora do canal radicular é dominada por bactérias anaeróbias nas quais um restrito grupo é mais ou menos presente em canais radiculares infectados. Anaeróbios facultativos tais como os estreptococos podem também apresentar uma significativa parte da flora, especialmente na porção coronária do canal radicular de dentes com a câmara pulpar exposta à cavidade oral por cáries. Inicialmente, as bactérias aeróbias são muito raramente encontradas em canais radiculares infectados, mas podem ser introduzidas no interior do canal durante o tratamento endodôntico. *Pseudomonas aeruginosa* é um exemplo de tal organismo.

KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGOPOLOU (1995) tomaram 40 microrganismos isolados de canais radiculares infectados de pacientes atendidos na Clínica de Endodontia

da Escola Dental, Universidade de Atenas, com o objetivo de avaliar em vitro a ação antimicrobiana do hidróxido de cálcio. O dente foi isolado da cavidade bucal com lençol de borracha e o procedimento de desinfecção foi realizado com tintura de iodo 5% e solução de álcool 10%. A amostragem foi realizada com uma ponta de papel estéril n.º 30, que permaneceu no interior do canal radicular por 30 segundos. Após esse período, a ponta de papel foi introduzida em um tubo com rosca contendo 0,9ml de RTF (Fluido de transporte reduzido). O fluido foi transportado para uma câmara de anaerobiose com 85% de N₂, 10% CO₂ e 5% H₂, dentro de 10 minutos após a coleta. Basicamente foram usadas placas de agar sangue. As amostras foram centrifugadas por 60 segundos em um misturador. Aliquotas de 0,1ml foram esparramadas sobre as placas e incubadas por cinco a sete dias a 37°C em uma câmara de anaerobiose. O grupo de anaeróbios obrigatórios incluía *Peptostreptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Fusobacterium* spp., *Peptococcus* spp., *Veillonella* spp. e *Bacteroides* spp., enquanto que o grupo de bactérias anaeróbias facultativas incluía *Capnocytophaga* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Eikenella* spp., *Micrococcus* spp. e *Haemophilus* spp..

Em 1995, WEIGER et al. compararam a microbiota dos canais radiculares e do trato fistuloso de dentes necróticos. Participaram desse estudo 11 pacientes e 12 dentes foram examinados microbiologicamente. A gengiva, a mucosa e a entrada da fistula foram lavados com digluconato de clorexidina 0,2%. A primeira ponta de papel estéril que foi introduzida, aproximadamente 1mm no interior da fistula, foi descartada. Subseqüentes três a cinco pontas de papel foram inseridas no interior da fistula até se sentir resistência. Cada ponta foi deixada nessa posição por vários segundos, sendo removida e imediatamente transferida para o interior de um tubo contendo 1ml de meio infuso de coração e cérebro pré-reduzido.

Também foram usadas pontas de papel absorvente estéreis para a amostragem do interior do canal radicular e transferidas para o mesmo meio citado anteriormente. O tempo entre a amostragem e o processamento laboratorial não foi superior a 30 minutos. Cada amostra foi dispersada com ultrassom. As amostras foram então inoculadas em placas de agar sangue (Columbia agar sangue) e agar infusão de coração e cérebro (Oxoid) suplementados com 5% de sangue de carneiro. As placas foram incubadas anaerobicamente, usando o kit GasPak e uma jarra por, no mínimo, 96 horas a 37°C. Em um segundo momento, foram incubadas sob condições microaerófilas. Todos os isolados anaeróbios foram caracterizados e identificados segundo métodos descritos pelo Laboratório do Instituto Politécnico Anaeróbico da Virginia (EUA). Nas lesões extra-radulares, os anaeróbios, *Fusobacterium nucleatum* (sete), *Prevotella intermedia* (quatro) e *Porphyromonas oralis* (quatro) foram os mais frequentemente isolados. No grupo dos anaeróbios facultativos, os *Streptococcus* spp. foram predominantes. Do canal radicular, *Prevotella intermedia* (seis), *Porphyromonas buccae* (cinco), *Fusobacterium nucleatum* (cinco), e *Lactobacillus plantarum* (cinco) foram os mais comumente isolados. Em nove casos, as espécies do canal radicular puderam ser reveladas em lesões extrarradiculares. Os autores concluíram que uma variedade de microrganismos são capazes de realizar a colonização endodôntica e induzir lesões extrarradiculares clinicamente caracterizadas por fistula.

ASSED et al. (1996) realizaram um estudo para avaliar a presença de microrganismos anaeróbios em canais radiculares de dentes humanos com periodontite apical crônica. Foram estudados 25 incisivos superiores centrais e laterais apresentando imagem radiográfica radiolúcida periapical. A câmara pulpar foi aberta em condições assépticas e as amostras do canal radicular foram coletadas com pontas de papel absorvente

estéreis, as quais foram colocadas e dispersadas em tubos teste contendo um fluido de transporte reduzido (RTF). A imunofluorescência indireta foi utilizada para detectar *Actinomyces viscosus*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Os resultados demonstraram uma positiva reação de imunofluorescência indireta em 24 das 25 amostras. Dessas, 14 foram positivas para a espécie *Actinomyces viscosus*, 12 para *Prevotella intermedia*, 10 para *Fusobacterium nucleatum* e quatro para *Porphyromonas gingivalis*.

SYDNEY; ESTRELA (1996) realizaram um estudo para avaliar a influência do preparo do canal radicular em bactérias anaeróbias presentes no canal radicular de dentes com periodontite apical assintomática. Uma primeira amostragem no canal radicular foi realizada e também após o uso do terceiro e quarto instrumento do seu preparo, formando um total de 90 espécimes dos 30 dentes anteriores superiores estudados. Os anaeróbios foram encontrados em todos os dentes selecionados com periodontite apical assintomática. Predominaram os bacilos anaeróbios Gram-positivos seguidos dos Gram-negativos.

NODA, INOUE e KOMATSU (1999) compararam a habilidade de detecção bacteriana de exsudatos intra-canal por dois métodos diferentes. Em ambos os métodos, o dente em questão foi isolado da cavidade bucal com lençol de borracha. Tanto o dente como a borracha foram desinfetados com solução de iodo e etanol 70%. 1º) O método convencional é realizado quando as amostras são transportadas dentro de câmaras de anaerobiose, imediatamente após a coleta para o laboratório. 2º) O método da pré-cultura é realizado quando as amostras são inoculadas em meio semi-sólido, imediatamente após a amostragem, incubadas por 24 horas sob condições anaeróbias e então transportadas ao

laboratório para identificação bacteriana. Com diagnóstico de periodontite apical crônica, 22 dentes foram selecionados de 16 pacientes. O dente foi isolado da cavidade bucal com lençol de borracha, e após procedimento de desinfecção, a amostragem foi realizada com o uso de pontas de papel absorvente estéreis, que permaneceram no interior do canal, durante 60 segundos. A identificação bacteriana foi feita usando VITEK 32 (Biomimerieux Japan Company Ltd.). O método da pré-cultura detectou bactérias em 18 dos 22 casos, enquanto o método convencional detectou bactérias em seis dos 22 casos. O método da pré-cultura demonstrou alta frequência significativa de detecção bacteriana. Cocos Gram-positivos (*α-Streptococcus*, *Enterococcus*, etc.) foram detectados em vários casos. Os resultados sugerem que o método da pré-cultura pode ser útil na detecção de bactérias do canal radicular, melhorando assim o tratamento antibiótico da doença endodôntica.

2.2. SINTOMÁTICOS

A correlação entre sintomas clínicos e microrganismos isolados de canais radiculares de dentes com patologia periapical vem sendo estudada desde a década de 70.

Em 1974, SABISTON; GOLD selecionaram cuidadosamente oito pacientes portadores de abscessos agudos flutuantes da cavidade oral para um exame microbiológico. A amostragem foi realizada através da aspiração de 1ml ou mais de pus. Os dados indicam, segundo os autores, que os abscessos orais possuem uma variedade de anaeróbios obrigatórios. *Fusobacterium nucleatum* foram encontradas em sete dos oito abscessos. Estreptococos facultativos foram encontrados em seis dos oito casos, sendo o principal componente em apenas um caso.

Em 1976, SABISTON; GRIGSBY; SEGERSTROM selecionaram 65 abscessos periapicais, com presença de edema flutuante eritematoso para a realização de um estudo bacteriológico. O exsudato foi obtido através da aspiração com o uso de seringa e agulha estéril. Algumas amostras foram realizadas com o uso de pontas de papel absorvente estéril após a abertura da câmara pulpar. Os anaeróbios obrigatórios compreenderam 65,9% do total de espécies isoladas, sendo que os bacilos anaeróbios Gram-negativos e estreptococos facultativos foram os grupos mais frequentemente isolados.

SUNDQVIST (1976), apud GRIFFEE et al. (1980), investigou microrganismos presentes no canal radicular de 32 dentes anteriores humanos intactos, com necrose pulpar devido a traumatismo. O autor utilizou uma variedade de meios de cultura, os quais foram incubados em aerobiose e anaerobiose. Foram identificadas 88 diferentes cepas bacterianas, incluindo 83 anaeróbios. Desses anaeróbios, três eram subespécies de *Bacteroides melaninogenicus* e foram encontrados em sete dentes com sintomas de inflamação periapical aguda. Nenhum dos 25 dentes sem sintomas continham *Bacteroides melaninogenicus*. Foi o primeiro autor a demonstrar uma aparente relação de causa e efeito entre microrganismos específicos e sintomas endodônticos.

SUNDQVIST et al. (1979) testaram a capacidade de combinações de bactérias de induzir a formação de abscessos e infecções transmissíveis. As bactérias foram isoladas de canais radiculares necróticos com presença de destruição periapical óssea. O experimento foi realizado inoculando-as sub-cutaneamente em porquinhos da índia. Infecções transmissíveis puderam ser induzidas através de combinações de bactérias obtidas de dentes sintomáticos. Entretanto combinações bacterianas de dentes assintomáticos com inflamação

crônica não apresentaram essa possibilidade. Todas as combinações, que resultaram em infecções transmissíveis, continham traços de *Bacteroides melaninogenicus* e *Bacteroides asacharolyticus*. Os resultados sugerem que a inflamação purulenta na região apical, em certos casos, pode ser induzida por combinações específicas de bactérias no canal radicular e que a presença do *Bacteroides melaninogenicus* ou *Bacteroides asacharolyticus* é essencial em tais combinações. Entretanto, apenas com uma exceção, as bactérias necessitaram de um suporte adicional de microrganismos para atingir a patogenia. Os resultados indicaram que o *Peptostreptococcus micros* também foi essencial para atingir a patogenicidade. Secções histológicas das lesões nas cobaias demonstraram que todas as combinações de bactérias induziram a formação de processo inflamatório agudo, com acúmulo de leucócitos e a formação de abscessos. Todavia, a presença de *Bacteroides melaninogenicus* ou *Bacteroides asacharolyticus* nas combinações resultou em fracasso na resolução do abscesso, favorecendo um acúmulo gradual e crescente de leucócitos e, portanto, quadro agudo supurativo.

ZAVISTOSKI et al. (1980) realizaram um estudo quantitativo da bacteriologia das infecções endodônticas. Para tanto, os autores analisaram 10 dentes necróticos de pacientes que procuraram o Serviço Dentário, queixando-se de dor. Os dentes foram isolados com lençol de borracha e tanto o dente como a borracha foram desinfetados com quatro aplicações de merthiolate seguido de uma lavagem com hipoclorito de sódio a 5,25%. Após a desinfecção, uma ponta de papel estéril foi esfregada sobre a superfície do dente e inserida imediatamente em um caldo de glicose pré-reduzido de carne picada. Estes espécimes foram usados como controle qualitativo para determinar a adequada descontaminação da superfície. Uma segunda amostragem, do interior do canal radicular,

foi realizada após a abertura da câmara pulpar, também com o uso de pontas de papel. A incubação foi feita em aerobiose e em anaerobiose com o uso de uma câmara de anaerobiose. Os espécimes foram obtidos de 14 pacientes sendo que 10 pacientes não demonstraram crescimento bacteriano no caldo de cultura da amostra da superfície do dente. Os resultados do estudo foram baseados somente nesses 10 pacientes. Os anaeróbios foram encontrados em 64% de todas as espécies isoladas e em 90% dos casos foi encontrada uma flora mista de anaeróbios e aeróbios.

GRIFFEE et al. (1980) estudaram a relação dos *Bacteroides melaninogenicus* com os sintomas da necrose pulpar. Foram escolhidos 33 dentes de 33 pacientes que apresentavam necrose pulpar e/ou presença de rarefação apical. Os dentes com cáries, fraturados e restaurados foram usados no estudo, bem como dois dentes intactos que apresentavam necrose pulpar devido a trauma. Dentes sintomáticos e assintomáticos foram usados com o propósito de comparação. As superfícies dos dentes foram desinfetadas através da técnica descrita por Möller¹. As amostras foram obtidas seguindo os procedimentos descritos por Möller e Sundqvist². Os autores concluíram que os anaeróbios são relevantes na patogênese de problemas endodônticos. O *Bacteroides melaninogenicus* é um patógeno importante no desenvolvimento dos sintomas comumente associados com necrose pulpar. Esse microrganismo é significativamente relacionado com odor fétido, dor, formação de fistula e está provavelmente relacionado com edema e sensibilidade à digitação apical. Entretanto, não foi significativa a relação entre a presença ou ausência de *Bacteroides melaninogenicus* e rarefação periapical, sensibilidade à percussão e presença de exsudato.

¹MÖLLER (1966), apud GRIFFEE et al. (1980) descrito anteriormente na página 4.

²MÖLLER (1966) e SUNDQVIST (1976), apud GRIFFEE et al. (1980) descrito anteriormente na página 4 e 5.

Também em 1980, ATTEBERY; KIMURA; CARROLL realizaram um estudo em uma infecção aguda seguida de uma instrumentação inicial dos canais radiculares de um primeiro molar inferior esquerdo com lesão apical crônica. A amostragem foi realizada com aspiração do material do edema bucal. A seringa, com o material em seu interior, foi selada e levada para o exame laboratorial. As bactérias anaeróbicas foram classificadas de acordo com procedimentos do Laboratório do Instituto Politécnico Anaeróbico da Virgínia (EUA). Os estudos laboratoriais demonstraram apenas anaeróbios obrigatórios no material infectado, incluindo *Bacteroides ochraceus*, *Bacteroides melaninogenicus* subespécies *intermedius*, *Veillonella parvula* e uma espiroqueta.

KANNANGARA; THADEPALLI; McQUIRTER (1980) analisaram a bacteriologia e o tratamento de infecções dentárias refratárias, em 61 pacientes, durante dois anos. O diagnóstico clínico incluiu: a) infecção pós-traumáticas de mandíbula, com fratura (20); b) abscessos dentários (17); c) osteomielite de mandíbula (15); d) infecção pós-extração (sete); e) infecção sub-mandibular e de tecidos moles (duas). O pus drenado cirurgicamente ou drenado a partir de fistulas externas e fragmentos necróticos de tecido ósseo foram processados. Outras culturas foram coletadas, no local da infecção, diretamente através de aspiração com agulha e seringa. O material foi processado em atmosfera aeróbica e anaeróbica. Os microrganismos aeróbios foram encontrados em 41 pacientes (67%) e destes, 59% eram cocos Gram-positivos. Os *Streptococcus epidermidis* foram os aeróbios isolados com maior frequência, encontrado em 27 pacientes (44%). Os bacilos aeróbios Gram-negativos foram isolados em 13 pacientes (21%). Apenas em um espécime foram encontradas *Pseudomonas aeruginosa*. Infecções anaeróbias foram encontradas em 45 pacientes (74%), e em 13 delas os anaeróbios foram isolados exclusivamente. Ausência de

anaeróbios foi encontrada em nove pacientes (15%) e em sete casos não houve qualquer crescimento bacteriano. *Bacteroides fragilis* foram isolados em 18 pacientes, e em seis casos foram resistentes à penicilina (16ug/ml), mas todos foram suscetíveis à clindamicina (<2ug/ml). Os autores relataram que infecções dentárias associadas com fraturas mandibulares, que fracassaram frente à terapia convencional com penicilina, devem ser rotineiramente cultivadas para *Bacteroides fragilis*.

A bacteriologia de infecções piogênicas de origem dentária foi estudada, em 1981, por ADERHOLD; KNOTHE; FRENKEL. Foram selecionados para o estudo 50 abscessos agudos de origem dentária. A amostra foi obtida através de aspiração do exsudato purulento em 52% dos casos coletados extra-oralmente e em 48% coletados intra-oralmente. Em 68% dos casos houve um crescimento misto de aeróbios e anaeróbios. Em 28% houve o crescimento apenas anaeróbio e em 4%, apenas aeróbio. A combinação *Streptococcus* aeróbios e *Bacteroides* foi isolada em 60% dos casos.

VON KONOW; NORD; NORDENRAN (1981) realizaram um estudo em 57 pacientes, portadores de infecções dento-alveolares. Dessas infecções, 39 eram de origem periapical, nove de origem periodontal, e nove eram abscessos pós-operatórios subseqüentes à cirurgia de dentes impactados e cirurgia periapical. As amostras para investigação bacteriológica foram obtidas através de aspiração com o uso agulhas e seringas através da mucosa ou pele intactas. Após esse procedimento, as amostras foram imediatamente inoculadas em meio sólido e líquido e incubadas aerobicamente e anaerobicamente por 10 dias. Todos os procedimentos do meio anaeróbio foram realizados em câmara de anaerobiose (Coy, Ann Arbor, Michigan, USA) sob uma atmosfera de 90% (v/v) nitrogênio

e 10% (v/v) hidrogênio. Uma média de quatro espécies bacterianas por espécime foi obtida, e apenas um terço das espécies eram aeróbias. Entre as bactérias aeróbias, os *Streptococcus* predominaram e entre os anaeróbios os bacilos Gram-negativos, *Bacteroides ruminola*, *Fusobacterium nucleatum* foram os mais freqüentemente isolados, seguidos de cocos Gram-positivos, em particular *Streptococcus intermedius*.

MÖLLER et al. (1981) realizaram um estudo que revelou o forte papel da bactéria na etiologia e desenvolvimento de periodontites apicais. O estudo foi realizado em nove macacos que tiveram as polpas necrosadas aseticamente em 78 dentes. As câmaras pulpares de 26 dentes foram mantidas sem bactérias com o uso de um selamento, enquanto 52 foram infectadas pela flora oral indígena. Os resultados clínicos, radiográficos e microbiológicos foram registrados no início do experimento e também após seis a sete meses. No final do experimento foram feitos registros histológicos. Os canais radiculares inicialmente não infectados estavam todos estéreis na amostragem final, indicando que o risco de contaminação (incluindo hematógenos) no canal radicular destes animais é muito leve. Isso demonstrou que o tecido pulpar necrótico não infectado não induz a uma reação inflamatória nos tecidos periapicais. Pelo contrário, dentes com o tecido pulpar infectado demonstraram reação inflamatória clinicamente em 12 dos 52 dentes e radiograficamente, em 47 dos 52 dentes. Estreptococos anaeróbios facultativos, bacilos coliformes e bactérias anaeróbias obrigatórias foram os organismos mais freqüentemente encontrados. No final da amostragem, foi verificado que o número de anaeróbios obrigatórios havia aumentado e alguns microrganismos encontrados na amostragem inicial não foram encontrados na amostragem final. Todos os dentes infectados, ao exame histológico, demonstraram forte reação inflamatória na região periapical. Os autores concluíram que a exposição dos túbulos

dentinários ou micro fraturas adjacentes ao sulco gengival ou na profundidade da bolsa periodontal são os mais prováveis caminhos para a infecção endodôntica.

BROOK; GRIMM; KIELICH (1981) estudando a bacteriologia dos abscessos periapicais agudos em crianças, concluíram que os organismos anaeróbios representam um papel fundamental na etiologia polimicrobiana desses abscessos. Os espécimes foram obtidos de 12 crianças tratadas na clínica dentária no Centro Médico do Hospital Nacional de Crianças entre setembro de 1977 e janeiro de 1980. Todos os pacientes apresentavam abscesso periapical e nenhum recebeu terapia antibiótica antes da coleta da amostra. Os espécimes de pus foram obtidos pela aspiração com uma seringa e agulha, antes da incisão do abscesso. O material foi inoculado em meio que ofereceu substrato para microrganismos aeróbios e anaeróbios. As placas com sangue de carneiro, agar chocolate e MacConkey foram inoculadas em aerobiose. As placas foram incubadas aerobicamente a 37°C (MacConkey) ou sob 5% de CO₂ e examinadas em torno de 24 a 48 horas. Para anaeróbios, o material foi colocado em vitamina K pré-reduzida e enriquecida com agar sangue brucella. Uma placa continha agar sangue, kanamicina 75mg/ml e vancomicina 7,5mg/ml, outra placa de agar sangue continha álcool fenil etílico e sobre caldo enriquecido com tioglicolato (contendo hemina, bicarbonato de sódio e vitamina K). As placas foram incubadas em jarra de GasPak e examinadas em 48 e 96 horas. O caldo de tioglicolato foi incubado por 14 dias. Os microrganismos anaeróbios foram isolados em todos os pacientes. No entanto, oito pacientes (67%) apresentaram como flora exclusiva, quatro pacientes (33%) apresentaram crescimento misto de anaeróbios e aeróbios. Dos 53 anaeróbios isolados (4,4 por espécime) estavam presentes: 20 espécies de *Bacteroides* (incluindo nove *Bacteroides melaninogenicus*, três *Bacteroides oralis* e três *Bacteroides corrodens*), 17

cocos anaeróbicos gram positivos, cinco espécies de *Fusobacterium* e três espécies de *Actinomyces*. Foram isolados seis aeróbios (cinco por espécime): três *Streptococcus salivarius*, dois *Streptococcus* alfa hemolíticos e um *Streptococcus* gama hemolítico. No estudo, é citada a importância dos anaeróbios nos abscessos periapicais, pois a partir de um foco dental podem ser originadas infecções como bacteremias, endocardites, sinusites, meningites, empiemas subdurais, abscessos cerebrais e empiemas pulmonares.

Em 1982, OGUNTEBI et al. estudaram a microflora de dentes com abscesso periapical livres de doença periodontal. Os 10 pacientes que participaram desse estudo sofreram uma limpeza da mucosa oral sobre o abscesso com tintura de iodo, antes da aspiração do espécime. O material foi transportado dentro da própria seringa selada com um bloco de borracha, em uma jarra de anaerobiose (BBL Microbiology Systems) para ser colocado em uma câmara de anaerobiose, contendo uma atmosfera de 85% N₂, 10% H₂, e 5% CO₂. Dentro de 10 minutos, o conteúdo da seringa foi expelido em 10ml de solução pré-reduzida de Ringer suplementada com cisteína (4,5mg/ml) e metafosfato de sódio (5mg/ml). A suspensão foi agitada em um misturador para efetuar a ruptura da massa bacteriana. As amostras foram examinadas quanto à morfologia e à motilidade dos tipos celulares. O restante das amostras foi diluída em uma solução de Ringer modificada e 0,02ml das diluições foram colocadas dentro dos seguintes meios: agar sangue contendo 5% de sangue de carneiro, agar seletivo para *Actinomyces*, *mitis salivarius* agar, um meio seletivo para *Fusobacterium* e um meio seletivo para *Eikenella corrodens*. As placas semeadas foram incubadas sob atmosfera anaeróbica, microaerófila (jarra com vela) e aeróbica por sete dias a 37°C. Um total de 25 grupos bacterianos foram isolados: 10 cocos anaeróbios facultativos Gram-positivos, três cocos anaeróbios Gram-positivos, nove bacilos anaeróbios Gram-

negativos e três bacilos pleomórficos anaeróbios Gram-positivos. Os microrganismos mais freqüentemente isolados foram *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus mitis*. Os dados sugerem que essas bactérias podem ser um par freqüente pois foram encontradas em seis dos 10 casos.

LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983) estudaram, durante dois anos, a microbiologia de 50 abscessos orofaciais. As causas da infecção foram divididas em categorias: 1º) odontogênicas (infecções pulpares, periodontais ou pericoronarites); 2º) pós-operatórias (infecções decorrentes de procedimentos de exodontia); 3º) fraturas; 4º) lesões de pele (furúnculos). A coleta do material foi por aspiração com seringas e agulhas estéreis, intra ou extra-oralmente. Os espécimes foram incubados em condições aeróbicas e anaeróbicas. Os autores verificaram o predomínio de patógenos anaeróbios. Em 86% das espécimes havia microrganismos anaeróbios e nesse grupo 39% eram resistentes à penicilina. Os gêneros anaeróbios mais freqüentemente isolados foram os seguintes: *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* e *Peptococcus*.

Com o propósito de avaliar a complexidade da flora bacteriana de abscessos presuntivamente de origem endodôntica, WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983) aspiraram material de 10 abscessos com edema flutuante. O pus aspirado foi transportado, em um meio anaeróbio pré-reduzido de Williams e colaboradores, diretamente para uma câmara de anaerobiose (Coy Manufacturing Co., Ann Arbor, Mich.). Foram feitas 10 diluições em tubos contendo meio de transporte pré-reduzido anaeróbico estéril. As amostras de cada diluição foram semeadas em placas de agar sangue feitas com Columbia agar base (BBL Microbiology Systems, Cockeysville) enriquecido com menadione

(0,5ug/ml), hemina (5ug/ml) e 5% de sangue de carneiro desfibrinado. As placas foram incubadas em câmara de anaerobiose a 37°C durante seis a sete dias. Inicialmente, foi feita a identificação dos gêneros bacterianos. Após, foram usados uma bateria de oito testes ou observações: a) reação de Gram; b) morfologia celular (Gram e microscopia de campo escuro); c) morfologia colonial; d) reação catalase; e) produção de indol; f) redução do nitrato; g) habilidade de crescimento em 10% de dióxido de carbono; h) análise cromatográfica. Foram isoladas bactérias anaeróbias em nove dos 10 abscessos, sendo em seis casos, cultura pura de anaeróbios. Os anaeróbios compreendem 70% do total das culturas isoladas. Houve uma média de 4,5 espécies bacterianas por espécime. Os bacilos anaeróbios Gram-negativos representam o maior grupo de isolados, ocorrendo em 37% do total de isolados, sendo que estavam presentes em nove dos 10 casos de abscessos. Os mais numerosos membros desse grupo foram *Fusobacterium nucleatum* (15% do total de isolados) e *Bacteroides melaninogenicus* subespécie *melaninogenicus* (4%). Os cocos anaeróbios ocorreram em 25,6% de todos os isolados. *Peptostreptococcus micros* foi a espécie predominante nesse grupo. Um abscesso teve uma cultura pura de *Streptococcus* do grupo viridans, *Streptococcus milleri*.

Com o propósito de investigar a relação entre o curso clínico e as conclusões microbiológicas de infecções orofaciais odontogênicas agudas, HEIMDAHL et al. (1985) classificaram as infecções de 58 pacientes em leves ou severas. Nas infecções leves a temperatura do paciente era abaixo de 38°C e a infecção estava limitada ao osso alveolar ou estendia-se sem comprometer espaços anatômicos adjacentes e sem causar trismo significante, edema ou dor. Nas infecções severas a temperatura do paciente era acima de 38°C e a infecção estendia-se além do processo alveolar, comprometendo espaços

anatômicos adjacentes ou causando marcado trismo, edema ou dor. Os espécimes de pus foram obtidos com aspiração através da mucosa intacta ou da pele. As seringas foram seladas e transportadas para o laboratório, para o processamento. As amostras foram imediatamente inoculadas em meios sólidos seletivo, não seletivo e em meio líquido não seletivo e incubadas aerobicamente e anaerobicamente por 10 dias. Todas as manipulações em meios anaeróbicos foram feitas em câmara de anaerobiose (Coy Laboratory Products, Ann Arbor, Michigan). Foram isolados um total de 174 grupos bacterianos anaeróbios e 22 aeróbios. Os bacilos anaeróbios Gram-negativos foram isolados com maior frequência nos casos classificados como infecções severas do que nos casos classificados como infecções leves. A ocorrência de *Fusobacterium nucleatum* e *Streptococcus milleri* foi apontada como uma possível associação em infecções severas.

Em 1985, VAN WINKELHOFF; CARLEE; GRAAFF realizaram um estudo com o propósito de examinar a ocorrência de espécies de *Bacteroides* pigmentados por preto em abscessos odontogênicos, apresentando especial atenção ao *Bacteroides endodontalis*. Foram examinados 28 pacientes portadores de abscesso odontogênico. Todas as amostras de pus foram obtidas através de incisões na mucosa oral, coletadas com *swab*, exceto em um paciente do qual o pus foi coletado após exposição da cavidade pulpar. As amostras foram transportadas em meio sólido de carvão (Microdiagnostics Puurs, Belgium) e processadas dentro de 15 minutos. As placas semeadas foram incubadas em jarra de anaerobiose, durante sete dias, a 37°C. Os abscessos foram classificados em: a) abscesso periapical; b) abscesso periodontal; c) abscesso pericoronário; d) abscesso pós-extração. Das 28 amostras, 26 apresentavam uma ou mais espécies de *Bacteroides* pigmentados por preto. Os *Bacteroides endodontalis* foram isolados quase que exclusivamente de abscessos

periapicais. *Bacteroides intermedius* foi a espécie mais freqüentemente isolada de todas as amostras. *Bacteroides gingivalis* estava presente em todos os abscessos periodontais estudados, bem como em dois abscessos periapicais. *Bacteroides melaninogenicus* foi encontrado uma vez em um abscesso pericoronário.

A incidência de *Bacteroides* pigmentados por preto em canais radiculares de dentes portadores de periodontite apical foi verificada por HAAPASALO et al. (1986). Esses autores estudaram 62 canais radiculares de humanos, sendo 35 casos de periodontite apical aguda e 27 casos clinicamente assintomáticos. Os dentes foram isolados da cavidade bucal com lençol de borracha e a desinfecção do dente e lençol foi realizada com H₂O₂ 10% e 0,5% de gluconato de clorexidina em etanol 70%. A coleta do material foi realizada com ponta de papel absorvente, que foi inserida no interior do canal radicular até, aproximadamente, a região apical. O material infectado foi imediatamente espalhado sobre placas de agar com a ponta de papel. Os seguintes meios foram usados para o cultivo inicial: agar sangue de carneiro com kanamicina (75ug/ml) e vancomicina (7,5ug/ml), agar sangue de cavalo suplementado não seletivo e agar chocolate. As placas, após semeadas, foram imediatamente colocadas em uma jarra de anaerobiose (BBL) e incubadas em atmosfera de anaerobiose por sete dias, a 37°C. As espécies de *Bacteroides* foram encontradas em ambas as infecções sintomáticas e assintomáticas, mas houve também vários casos sintomáticos onde espécies de *Bacteroides* não foram isoladas. *Bacteroides gingivalis* e *Bacteroides endodontalis* estavam presentes apenas em infecções agudas, *Bacteroides intermedius* foi encontrado em ambas infecções (sintomáticas e assintomáticas) e *Bacteroides denticola* ocorreu principalmente em infecções assintomáticas.

Em 1986, LEWIS; MacFARLANE; McGOWAN realizaram um estudo bacteriológico de abscessos dento-alveolares agudos. As amostras de pus foram obtidas através de aspiração com agulha e seringa de 50 pacientes portadores de abscesso periapical que se estendeu através do osso alveolar, produzindo um edema intra-oral flutuante. O espécime foi levado imediatamente para o laboratório para o processamento. Cada amostra (0,5ml) foi diluída em 19,5ml de caldo de sangue anaeróbio (Gibco) e misturado pela agitação mecânica (Whirlmixer, Fisons Scientific Ltd), sob condições anaeróbicas por 30 segundos. Os meios utilizados para inoculação foram: Columbia agar sangue (Oxoid) e meio seletivo *Campylobacter* modificado (Gibco). As placas foram incubadas a 37°C por sete a 10 dias em uma câmara de anaerobiose. A maioria das amostras continha uma mistura de espécies. Em 40% dos abscessos foram encontrados apenas anaeróbios. Em 6%, apenas anaeróbios facultativos e os restantes 54% continham misturas de ambas as bactérias, com predomínio de anaeróbios. No total de 166 grupos bacterianos isolados, 75% eram anaeróbios estritos. As espécies mais comuns foram *Peptococcus* spp. *Bacteroides oralis* e *Bacteroides melaninogenicus*. Entre os anaeróbios facultativos, *Streptococcus milleri* foi particularmente comum.

NAIR (1987) realizou um estudo em 30 granulomas e um cisto radicular obtidos de dentes extraídos. Todos os 31 dentes apresentaram bactéria no interior do canal radicular. A flora endodôntica consistiu de uma mistura de cocos, bacilos, formas filamentosas e espiroquetas. Foi verificado que apenas uma fração pequena das lesões periapicais revelava bactérias dentro do corpo da lesão. Tais lesões eram invariavelmente agudas e sintomáticas.

A correlação entre sintomas clínicos e microrganismos isolados de canais radiculares de dentes com patologia periapical foi estudada por YOSHIDA et al. (1987) em 36 pacientes do Departamento de Endodontia da Universidade de Osaka. Os pacientes foram divididos em três grupos que mostravam combinação de sintomas. Os espécimes do grupo 1 apresentavam dor espontânea, dor à percussão e exsudato; no grupo 2 havia presença de dor à percussão, mas não dor espontânea; os espécimes do grupo 3 se apresentavam sem dor espontânea, sem exsudato e sem dor à percussão (grupo controle). A amostragem foi realizada sob o uso de gás anaeróbio (80% de nitrogênio, 10% de hidrogênio e 10% de dióxido de carbono) para garantir a anaerobiose. Os autores sugerem que nos dentes com ausência de sintomas clínicos havia um número menor de colônias isoladas, quando comparados com dentes onde os sintomas clínicos estavam presentes. Nesse estudo, o grupo de dentes que apresentavam dor espontânea, dor à percussão e com exsudato apresentaram mais de 79% de microrganismos anaeróbios. Entre os anaeróbios, *Eubacterium*, *Bacteroides* e *Peptostreptococcus* foram as espécies freqüentemente encontradas. Nos dentes assintomáticos, predominaram os anaeróbios facultativos.

TROPE et al. (1988), utilizando a microscopia de campo escuro como auxiliar no diagnóstico diferencial de exsudatos de abscessos periodontais e periapicais, verificaram uma distinta variação no percentual de espiroquetas. Em abscessos periodontais a ocorrência de espiroquetas variou de 30 a 60%, enquanto que em abscessos periapicais a variação foi de 0% a 10%. Participaram desse estudo 17 pacientes portadores de abscessos dentários. No estudo, oito desses abscessos foram diagnosticados clinicamente como de origem periapical e nove, como de origem periodontal.

HAAPASALO (1989) fez um relato sobre a bacteriologia de 62 canais radiculares humanos infectados, dando atenção especial às espécies *Bacteroides*. Foram incluídos nesse estudo 57 pacientes adultos com periodontite apical do Departamento de Cariologia da Universidade de Helsinki. Antes da amostragem dos 62 dentes monorradiculares, um procedimento de desinfecção prévio foi realizado, segundo Möller³. A amostragem foi realizada com o uso de ponta de papel absorvente estéril, que foi introduzida no interior do canal radicular. O material infectado, na ponta de papel, foi colocado sobre três diferentes placas de agar. As placas foram imediatamente incubadas anaerobicamente a 37°C, em jarra de anaerobiose. Seus resultados confirmaram as descobertas de investigações anteriores: quase todas as infecções dos canais radiculares são mistas e os sintomas agudos estão usualmente relacionados à presença de anaeróbios específicos, tais como *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides endodontalis* e *Bacteroides buccae*.

SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar a prevalência de espécies de *Bacteroides* pigmentados com preto em infecções do canal radicular. Participaram deste estudo 63 pacientes tratados no Departamento de Endodontia da Universidade de Umea, Suécia. Nenhum paciente estava sob antibioticoterapia. O dente foi polido com pedra-pomes e isolado da cavidade bucal com lençol de borracha. Os procedimentos descritos por Möller³ foram usados para desinfecção do dente e lençol de borracha. Se no momento da abertura havia presença de exsudato, o mesmo foi absorvido com pontas de papel tratadas com carvão. Quando não havia exsudato, uma pequena quantidade de solução salina estéril (0,85%) foi introduzida no canal com o uso de uma seringa. O fluido foi agitado no canal com uma lima. Após, o fluido foi absorvido com o uso de ponta de papel tratada com carvão. A mesma foi

³MÖLLER (1966), apud GRIFFEE et al. (1980) descrito anteriormente na página 4.

diretamente transferida para um tubo contendo 5ml de caldo de levedura glicose peptona (PYG) ou caldo de glicose com carne picada. O PYG ou o caldo de glicose com carne picada contendo o espécime foi introduzido em uma câmara de anaerobiose (85% N₂, 10% H₂, 5% CO₂). Os tubos, os quais continham bolinhas de vidro foram agitados em um misturador mecânico até as pontas de papel ficarem desintegradas. As diluições foram inoculadas em placas de agar sangue. Os autores concluíram que os *Bacteroides* pigmentados de preto estão envolvidos no desenvolvimento de abscessos apicais. A presença da combinação do *Bacteroides intermedius*, *Bacteroides endodontalis* ou *Bacteroides gingivalis* aumenta o risco de desenvolvimento de uma inflamação apical purulenta.

A microbiologia de 39 abscessos periapicais foi estudada por BROOK; FRAZIER; GHER (1991). Durante incisão cirúrgica e drenagem, a aspiração do conteúdo purulento foi realizada com agulha e seringa. Dentro da seringa, o material foi selado e transportado para o laboratório em 30 minutos, podendo ser também usado *swab* de pus. Para o isolamento de bactérias anaeróbias o material foi colocado em um meio pré-reduzido de Brucella agar enriquecido com vitamina K, em um meio anaeróbio com sangue e em um caldo de tioglicolato enriquecido com vitamina K e hemina, incubados em jarra de anaerobiose (BBL, Microbiology Systems) e examinados em 48 e 96 horas. Para a identificação de bactérias aeróbias, foram utilizados os meios agar sangue de carneiro (5%), agar chocolate e agar MacConkey. Um total de 78 isolados bacterianos (55 anaeróbios e 23 aeróbios e facultativos) foram encontrados, ocorrendo 2,4 isolados por espécime. Bactérias anaeróbias exclusivas foram isoladas de 16 pacientes (50%), aeróbios e facultativos em dois pacientes (6%) e uma flora mista de aeróbios e anaeróbios foi encontrada em 14 pacientes (44%). Os

isolados predominantes foram *Bacteroides* spp. (23 isolados incluindo 13 *Bacteroides* do grupo *melaninogenicus*), *Streptococcus* spp. (20 predominando no grupo de aeróbios), cocos anaeróbios (18) e *Fusobacterium* spp. (nove).

BAUMGARTNER (1991) relatou que a patogenia dos processos endodônticos está associada à virulência dos microrganismos e à resistência do hospedeiro. A virulência dos microrganismos pode ser influenciada pelas relações sinérgicas encontradas nas infecções polimicrobianas. O autor também relatou que nenhuma associação absoluta entre uma espécie individual de bactérias e sinais e sintomas de canais radiculares infectados foram feitas. As investigações demonstram que a presença de certos organismos, particularmente *Bacteroides*, *Peptostreptococcus* e *Fusobacterium* está associada com um aumento na incidência de alguns sinais e sintomas endodonticamente tratáveis.

Em 1992, TROPE; ROSENBERG; TRONSTAD descreveram dois casos clínicos, nos quais a contagem de espiroquetas através da microscopia de campo escuro foi de grande valor na diferenciação dos abscessos periodontais e periapicais. O abscesso periodontal teve uma média de 51% de espiroquetas e o abscesso periapical teve uma média de 4,7% das mesmas. A partir das conclusões da microscopia de campo escuro, o tratamento foi instituído. No abscesso periapical, foi feito o preparo do canal radicular, colocação de hidróxido de cálcio como medicamento de demora e obturação do canal após seis meses. No abscesso periodontal, foi realizada uma abordagem cirúrgica e a cura se deu em ambos os abscessos.

HASHIOKA et al. (1992), com o propósito de investigar a correlação entre a composição bacteriana de canais radiculares infectados e sintomas, selecionaram 25 pacientes adultos do Departamento de Endodontia de Aichi Gakuin University. A flora bacteriana de 28 dentes monorradiculares com periodontite apical foi examinada. Os dentes foram isolados da cavidade bucal com lençol de borracha e o procedimento de desinfecção do dente e superfícies foi realizado com solução de iodo-etanol 5% e etanol 70%. A amostra foi obtida com pontas de papel absorvente estéreis que foram introduzidas no interior do canal radicular até aproximadamente o ápice. Esse procedimento foi feito sob o uso de gás de nitrogênio a 99,9% (N₂). Os meios usados para o cultivo inicial foram agar contendo 5% de sangue de cavalo e suplementados com 0,05% hemina e 0,01% menadione. Todas as inoculações foram feitas em anaerobiose. Os resultados indicaram que existe uma relação positiva entre *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Porphyromonas* e *Bacteroides* isolados do canal radicular e dor à percussão. Também foi evidenciada associação de *Porphyromonas* e *Bacteroides* com presença de odor fétido.

VAN WINKELHOFF; STEENBERGEN; GRAAFF (1992) com o propósito de revisarem a função de *Porphyromonas endodontalis* em infecções dentárias, relataram que tal microrganismo parece estar especificamente envolvido em infecções endodônticas. As *Porphyromonas endodontalis* apresentam uma grande sensibilidade ao oxigênio atmosférico e isto pode ter contribuído para a baixa taxa de isolamento dessa espécie em outros estudos como o de HAAPASALO et al. (1986), que encontraram *Porphyromonas endodontalis* em apenas dois dos 62 casos de dentes com periodontite apical. Os autores citam que a taxonomia do grupo de bactérias anteriormente conhecido por *Bacteroides* pigmentados por preto sofreu grandes mudanças. Hoje, a nova designação é bacilos anaeróbios pigmentados

por preto e dois novos gêneros surgiram. O novo gênero *Prevotella* inclui quatro espécies de *Bacteroides* pigmentados por preto, são elas: *Prevotella intermedia* (anteriormente *Bacteroides intermedius*), *Prevotella melaninogenica* (anteriormente *Bacteroides melaninogenicus*), *Prevotella denticola* (anteriormente *Bacteroides denticola*) e *Prevotella loescheii* (anteriormente *Bacteroides loescheii*). O novo gênero *Porphyromonas* inclui três espécies de *Bacteroides* pigmentados por preto assacarolíticos: *Porphyromonas gingivalis* (anteriormente *Bacteroides gingivalis*), *Porphyromonas asaccharolytica* (anteriormente *Bacteroides asaccharolyticus*), *Porphyromonas endodontalis* (anteriormente *Bacteroides endodontalis*). A razão para esta mudança taxonômica é baseada nas diferenças bioquímicas entre as espécies do gênero *Bacteroides* (*Bacteroides fragilis*) e as espécies assacarolíticas. *Porphyromonas gingivalis* e *Porphyromonas endodontalis* estão ambas associadas a infecções orais, enquanto que *Porphyromonas asaccharolytica* está associada a infecções não orais.

Em abscessos dentários, os grupos de *Streptococcus milleri* são os microrganismos anaeróbios facultativos mais frequentemente isolados. FISHER; RUSSEL (1993) afirmaram essa assertiva quando examinaram microbiologicamente 45 pacientes adultos portadores de abscesso dento-alveolar agudo, com o objetivo de determinar a prevalência desse grupo de *Streptococcus*. Os autores citam que o grupo milleri foi reclassificado em três espécies distintas: *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus* e *Streptococcus intermedius*. Nesse estudo, 45 amostras de abscessos periapicais foram obtidas através de pontas de papel estéreis do interior dos canais radiculares que foram imediatamente colocadas em 5ml de fluido pré-reduzido de transporte. As placas de agar sangue usadas foram incubadas em câmara de anaerobiose por 48 horas em uma atmosfera de 85% N₂, 10% CO₂ e 5% H₂. As

placas seletivas foram incubadas em jarra com gerador de CO₂ GasPak, o qual também produziu uma concentração de CO₂ a 10%. Em 43 amostras houve crescimento bacteriano (96%). Os *Streptococcus* do grupo *milleri* foram isolados em 16 pacientes (37%). Nesse artigo, foi citado que esses microrganismos preparam o ambiente para o estabelecimento de infecções estritamente anaeróbias. Os grupos de *Streptococcus milleri* também podem agir com sinergismo com outras bactérias anaeróbias no desenvolvimento de abscessos periapicais.

Para associar bactérias específicas com alguns sinais e sintomas endodônticos, GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994) realizaram um estudo, onde foram incluídos 30 pacientes que foram atendidos no University Dental Hospital de Manchester. Os mesmos necessitavam de tratamento endodôntico. Para a amostragem microbiana, uma ponta de papel estéril foi introduzida no comprimento do canal radicular e mantida em posição por 60 segundos. Nos casos em que o canal estava seco, a ponta de papel foi umedecida em solução salina estéril para a aquisição de uma amostra viável. Esses procedimentos foram feitos com o uso de dique de borracha previamente desinfetado com gluconato de clorexidina 0,5%. Os autores isolaram 93% de anaeróbios nos canais radiculares com presença de dor espontânea e apenas 53% de anaeróbios nos canais sem dor espontânea. Entre os aeróbios, os *Streptococcus* do grupo *milleri* foram particularmente comum. Em três canais radiculares não houve crescimento bacteriano. Os resultados do estudo indicaram que existe uma relação significativa entre dor e a presença de espécies de *Prevotella* e *Peptostreptococcus* em canais radiculares.

BRAUNER; CONRADS (1995) estudaram a microbiologia de 19 dentes que apresentavam sintomas clínicos de pulpíte e 24 dentes sintomáticos com granuloma periapical. Os microrganismos isolados com maior frequência foram *Prevotella intermedia*, *Bifidobacterium* spp. e *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus* grupo *milleri* e *Bacteroides* spp.. Os anaeróbios obrigatórios ocorreram em uma taxa de 82,3% e a média de isolados foi de 6,4 por amostra. Eles concluíram que são muito similares as amostras isoladas dos dentes com pulpíte e dos dentes com granuloma qualitativamente, mas há uma diferente distribuição quantitativa. A média do número de espécies isoladas por amostra foi de 6,8 no granuloma e 5,7 do canal radicular dos dentes com pulpíte.

GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) realizaram um estudo com o propósito de examinar microbiologicamente a mais extensiva série de canais radiculares a fim de determinar se algum sintoma endodôntico ou sinal clínico apresenta uma associação específica com uma espécie bacteriana em particular. Para tanto, os autores examinaram microbiologicamente e coletaram dados clínicos para a realização de associações em 70 canais radiculares. Usando a mesma metodologia do estudo de 1994, os autores isolaram 70,3% de anaeróbios em canais radiculares sintomáticos e apenas 29,7% em canais assintomáticos. Em 10 canais radiculares não houve crescimento bacteriano.

Associações significativas foram encontradas entre:

- a) Dor: *Prevotella* spp. ou *Peptostreptococcus* spp.;
- b) Sensibilidade à percussão: *Prevotella* spp. ou anaeróbios;
- c) Edema: *Eubacterium* spp. ou com *Prevotella* spp. ou *Peptostreptococcus micros*;
- d) Exsudato purulento e qualquer um dos microrganismos: *Fusobacterium necrophorum*, *Prevotella loescheii*, *Streptococcus constellatus* ou *Bacteroides* spp.;

e) Canal úmido: anaeróbios facultativos e qualquer um dos seguintes gêneros: *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella* ou *Propionibacterium*.

Ainda em 1996, para associar sinais e sintomas endodônticos com combinações bacterianas específicas GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b) descreveram o mesmo estudo anteriormente descrito por eles em 1996, enfatizando a importância dos anaeróbios obrigatórios que ocorreram em 64% do total de espécies isolados, incluindo: *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella melaninogenica*, *Prevotella oralis*, *Eubacterium aerofaciens*, *Eubacterium lentum*, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella buccae* e *Prevotella intermedia* porém em outra revista.

LUIZI; FACHIN em 1999 citam que é indiscutível a prevalência de microrganismos anaeróbios em infecções endodônticas agudas, sendo os anaeróbios habitantes sinérgicos com a microbiota aeróbia. Além disso, salientam as dificuldades inerentes da pesquisa microbiológica nas infecções endodônticas. Um aspecto abordado é a pequena quantidade de material para cultura. As pesquisas microbiológicas são restritas aos fluidos dos canais radiculares que podem ser absorvidos com o uso de pontas de papel absorvente, inseridas comumente em um caldo para a incubação antes da cultura em placas de meio standard. A marcante presença de anaeróbios é ressaltada como etiopatogenia de periapicopatias agudas.

3. PROPOSIÇÃO:

Este estudo tem como propósito investigar a composição bacteriana de periapicopatias agudas, identificando os microrganismos encontrados nos canais radiculares necróticos.

4. MATERIAL E MÉTODO:

Onze pacientes adultos oriundos da Disciplina de Estágio Supervisionado II (Urgência) da Faculdade de Odontologia da UFRGS, portadores de periapicopatias agudas, foram incluídos no estudo (FIG. 1). O diagnóstico foi baseado no registro de informações do paciente, no exame clínico, radiográfico (FIG. 2) e teste de vitalidade pulpar com gás refrigerante.



FIGURA 1 - Ilustração de uma periapicopatia aguda, no dente 11, com a presença nítida de edema na região periapical.



FIG. 2 - Radiografia periapical pré-operatória do dente 11, portador de um processo periapical crônico em fase aguda.

Alguns pacientes foram eliminados da amostra por não apresentarem as condições ideais para o estudo da bacteriologia das infecções endodônticas agudas. Foram descartados os casos com relato de antibioticoterapia prévia, dentes com tratamento endodôntico prévio, contaminação do canal radicular com saliva (câmara pulpar aberta ao meio bucal) e impossibilidade de isolamento absoluto.

A amostra microbiológica foi realizada em sete dentes monorradiculares e em quatro dentes polirradiculares. Os dentes envolvidos neste estudo apresentavam-se cariados em sete casos e restaurados em quatro casos.

Os seguintes aspectos foram registrados de todos os pacientes em uma ficha clínica: nome, idade, sexo, raça, uso de medicação, presença de sensibilidade à digitação apical, dor à pressão e à percussão, presença de edema na região apical, odor fétido e aspecto radiográfico. Também foi feita a classificação da dor quanto ao estímulo, duração, intensidade e localização (Anexo 1).

As diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos foram seguidas de acordo com GOLDIN, 1997. Todos os pacientes que participaram da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento (Anexo 2).

O projeto de pesquisa do presente experimento foi aprovado pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia e pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da UFRGS (Anexo 3).

4.1. COLETA DO MATERIAL:

O dente portador de um processo periapical agudo foi individualmente isolado da cavidade bucal com lençol de borracha, e logo após, tanto o dente como a superfície externa do lençol de borracha foram desinfetados (FIG. 3 e 4) com solução de iodo-etanol 5% e etanol 70% (um a dois minutos antes da manipulação).

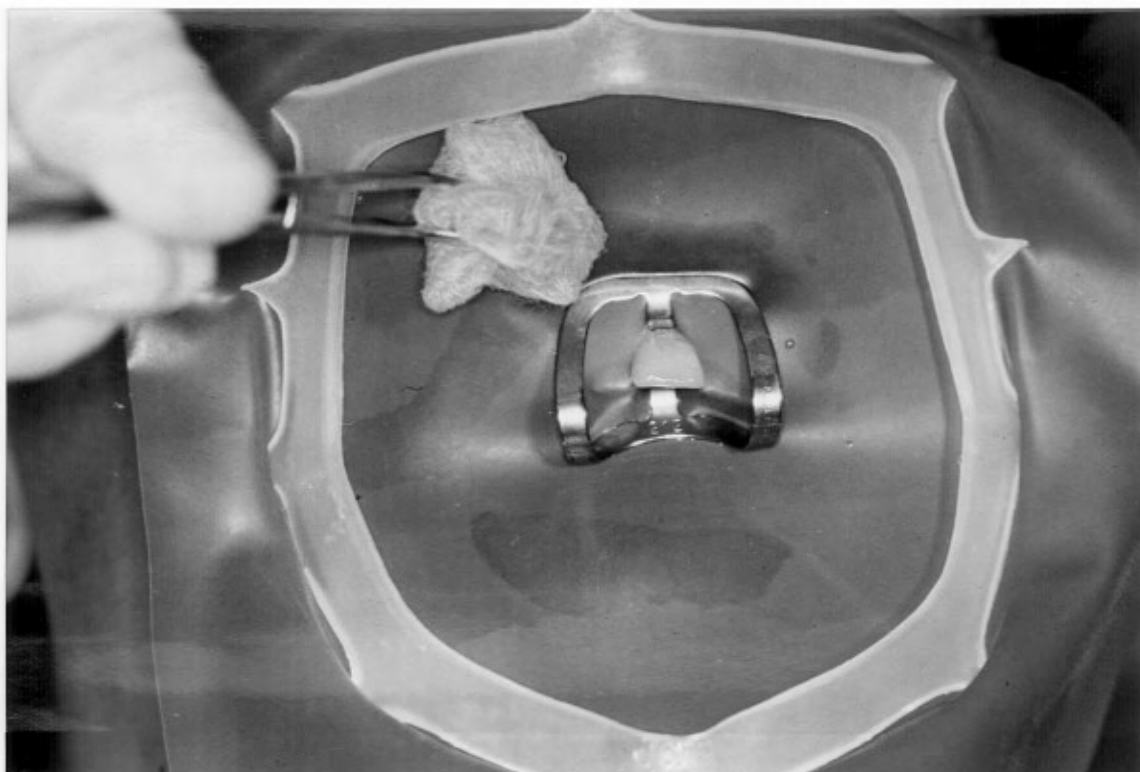


FIG. 3 - Procedimento de desinfecção com iodo-etanol 5%.

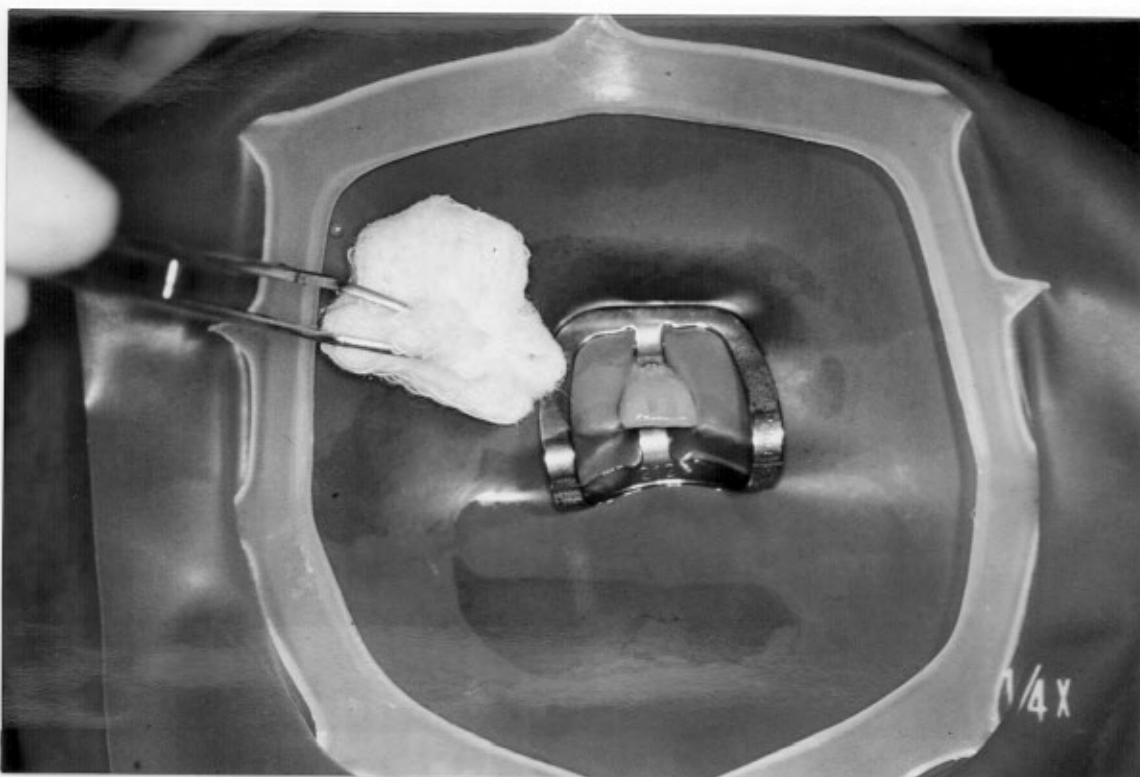
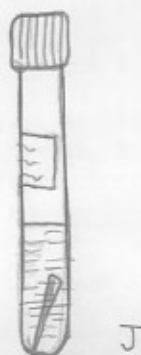
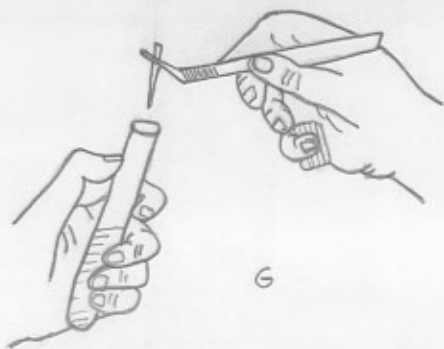
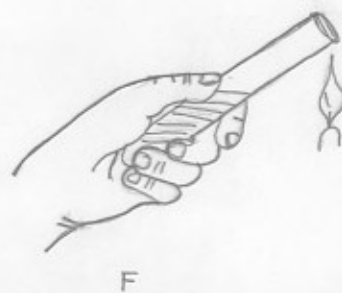
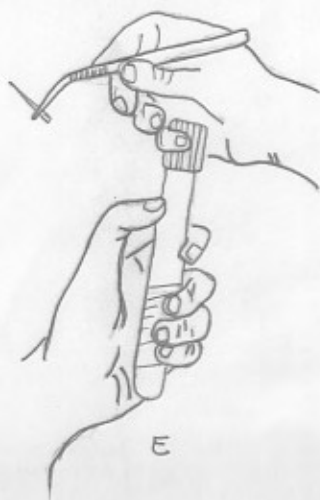
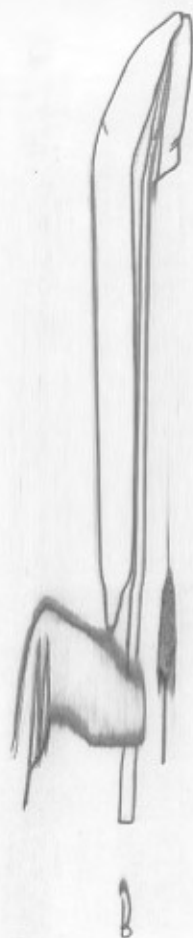


FIGURA 4 - Procedimento de desinfecção com etanol 70%.

O acesso à cavidade pulpar foi realizado inicialmente com brocas esféricas em alta rotação com refrigeração e imediatamente antes de entrar na câmara pulpar, foi feita uma desinfecção com etanol 70%. Para completar o acesso, foram usadas brocas esféricas de aço número dois e três em baixa rotação.

A amostragem foi feita a partir de um cone de papel absorvente estéril (Dentsply), selecionado com um diâmetro adequado para o canal radicular. Para tornar mais fácil a coleta do material nos dentes polirradiculares, o canal mais amplo foi amostrado. O comprimento do cone de papel a ser introduzido foi determinado com base na radiografia pré-operatória (realizada com a técnica da Bissetriz) e na média do comprimento do dente de acordo com MILANO; CAMINHA (1971), MILANO; GRASSI; BONORINO (1977) e MILANO; SILVA (1988). Usou-se a própria pinça como cursor para limitar o comprimento do cone de papel que permaneceu em toda a extensão do canal radicular durante 60 segundos. Após esse período, o mesmo foi removido do interior do canal radicular. Todos os cones de papel amostrados apresentavam evidência visual de absorção de exsudato. O procedimento seguinte foi realizado com o auxílio simultâneo das duas mãos: enquanto uma das mãos segurava o tubo de vidro com o meio de cultura, a outra, com a pinça, removia a tampa rosqueável do tubo. Como rotina clínica, esses movimentos eram realizados próximos à chama de uma lamparina. A boca do tubo foi imediatamente flambada e o cone de papel foi introduzido no interior do tubo de ensaio. Novamente a boca do tubo foi flambada, em seguida o mesmo foi vedado, com o cone de papel absorvente em seu interior (FIG. 5, 6 e 7).



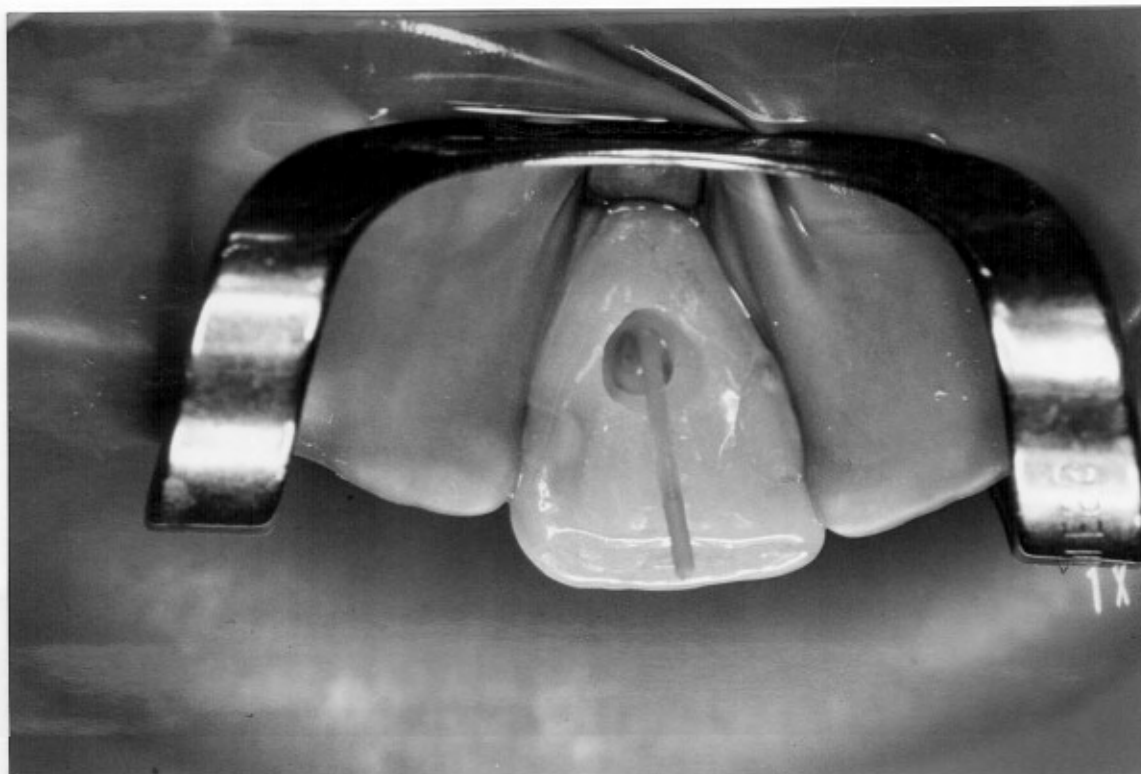


FIG. 6 - Cone de papel no interior do canal radicular para a coleta do material.



FIG. 7 - Tubos com tampa rosca contendo tioglicolato.

O tubo de cultura continha tioglicolato suplementado com hemina e vitamina K₁ (Thioglycollate Medium - 135C - BBL, fornecido pelo laboratório Weinmann). Segundo FINEGOLD; BARON (1986) o tioglicolato 135C BBL suplementado com hemina, vitamina K e bicarbonato de sódio é o melhor meio de cultura para anaeróbios. O tioglicolato foi regenerado imediatamente antes do uso. A regeneração de um meio de cultura consiste em fervê-lo para expulsar o oxigênio e levá-lo imediatamente ao banho de gelo. Para isso, a rosca do tubo de ensaio, com 5ml de tioglicolato, é levemente aberta e então, o tubo de ensaio é colocado em banho-maria em ebulição. O período de ebulição dura cinco minutos (1 minuto/ml de meio), em seguida fecha-se a tampa e um resfriamento imediato é realizado, colocando o tubo em um recipiente com gelo.

Em um prazo máximo de 30 minutos, o material era levado ao Laboratório Weinmann em Porto Alegre/RS (rua Ramiro Barcelos, 910/5º andar) acompanhado de uma requisição de solicitação de exames (Anexo 4). A equipe técnica do setor de bacteriologia do laboratório Weinmann realizou a semeadura aeróbica e anaeróbica, incubação e posterior identificação dos microrganismos.

Os princípios de semeadura estão descritos a seguir e os cuidados com assepsia estão de acordo com os preceitos descritos por SILVA; BERCHET (1997).

4.2. CULTURA MICROBIOLÓGICA:

O tubo de tioglicolato com o espécime foi incubado a 37°C, durante 48 horas em atmosfera convencional. Procedeu-se, a seguir, a semeadura em quatro diferentes meios de cultura, ilustrados com detalhes na (FIG. 8). A semeadura para aeróbios foi realizada em dois meios de cultura sólidos com seletividade variável constituídos por agar soja e caseína com sangue de carneiro 5% e agar MacConkey. Para a semeadura de anaeróbios foram utilizados agar Brucella sangue de carneiro e BBE (Bacteróides Bile Esculina).

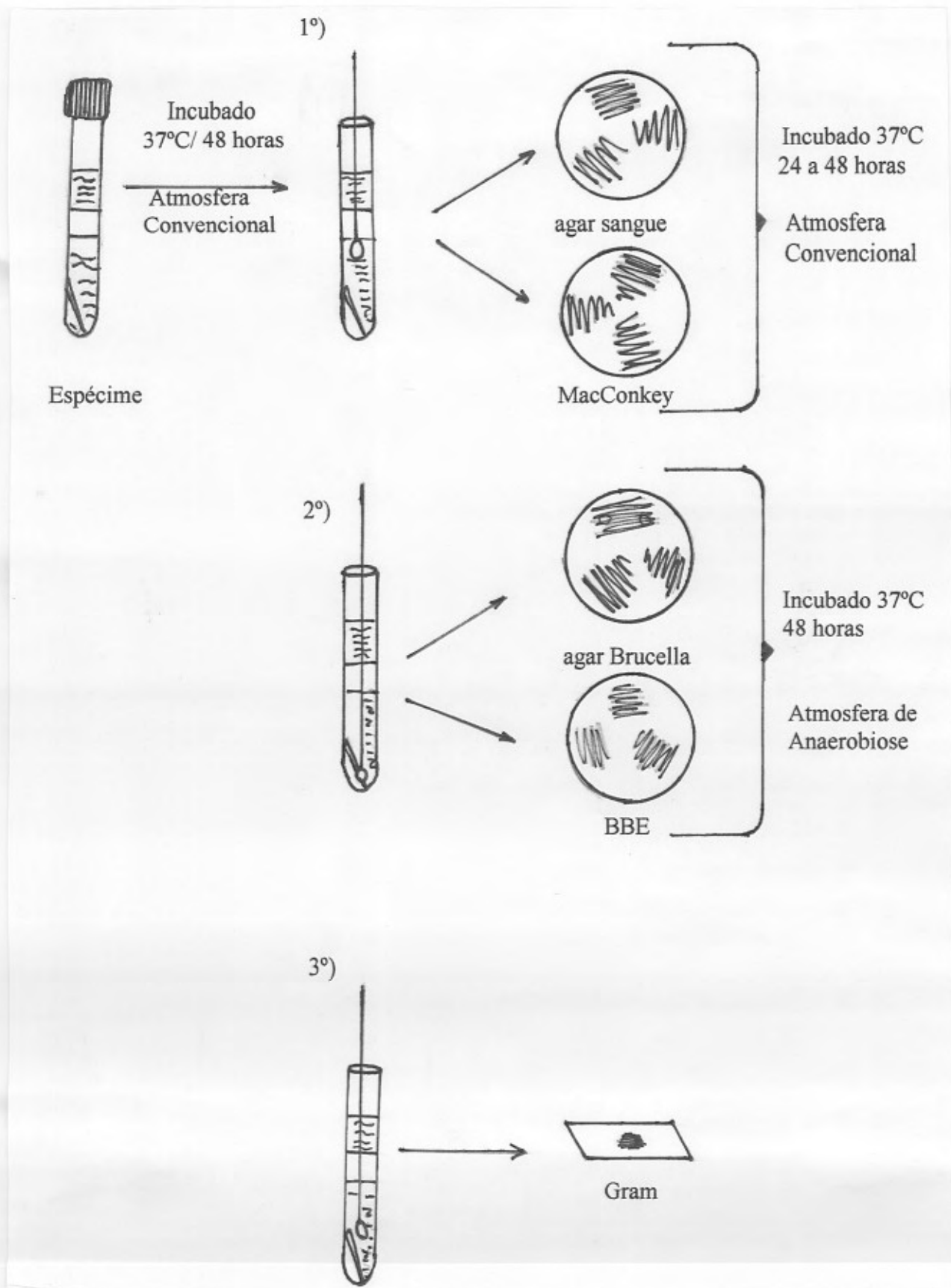


FIGURA 8 - Esquema de sementeira para cultura de aeróbios e anaeróbios.

A semeadura foi realizada pela introdução de uma alça bacteriológica flambada e resfriada, na porção mais superior do tioglicolato, e uma gota do material foi semeada sobre a superfície de cada um dos meios de cultura para a pesquisa de aeróbios. Posteriormente, a alça bacteriológica flambada e resfriada foi introduzida até a porção mais inferior do tubo de vidro contendo tioglicolato, para a realização da semeadura de uma gota de material, em cada um dos meios de cultura para pesquisa dos anaeróbios.

Após as semeaduras, uma gota do material foi depositada sobre uma lâmina de vidro. O material foi fixado pelo calor e a lâmina foi corada pelo método de Gram (modificado Kopeloff). A pesquisa direta foi realizada, através da observação da lâmina, em microscópio ótico (100X).

O método de Gram modificado Kopeloff consiste em cobrir a lâmina com violeta genciana, misturar na lâmina duas a três gotas da solução de bicarbonato de sódio e deixar agir por dois a três minutos. Após, lavar com lugol e cobrir a lâmina com o mesmo e deixar por dois minutos. Em seguida, lavar em água corrente e tirar o excesso de água. Descorar com éter-acetona na razão 1:1. Então, deve-se contrastar com fucsina cinco a 10 segundos, lavar em água corrente, secar ao ar e examinar no microscópio ótico. Ao exame, os microrganismos Gram-positivos ficam corados de roxo e os Gram-negativos ficam corados de vermelho. As soluções usadas são confeccionadas da seguinte forma: 1) Cristal violeta: cristal violeta 1g e água destilada 100ml, NaHCO_3 1g e água destilada 20ml; 2) Lugol: Iodo 2g e NaOH N 10ml, após a dissolução do iodo, completar 100ml com água destilada; 3) Fucsina: fucsina básica 0,1g e água destilada 100ml (CAUDURO; MEZZARI (1989)).

4.2.1. Pesquisa de bactérias aeróbias:

Os meios agar soja e caseína com sangue de carneiro 5% e agar MacConkey foram incubados a 37°C durante 24 a 48 horas em atmosfera convencional. A partir do

crescimento obtido, as colônias foram repicadas com fio de platina para meio líquido, caldo glicosado (Merck ou similar) e incubadas novamente a 37°C até 24 horas (crescimento normalmente ocorre em 6 a 8 horas).

Um Gram foi realizado, a partir do crescimento em caldo glicosado, para a observação da morfologia celular, que se constituiu dos seguintes grupamentos fundamentais: 1) bacilos Gram-negativos; 2) bacilos Gram-positivos; 3) cocos Gram-positivos, em aglomerados ou em cadeias; 4) cocos Gram-negativos; 5) leveduras.

A identificação bacteriana foi feita a partir de provas bioquímicas conforme métodos convencionais CAUDURO; MEZZARI (1989) e MURRAY (1995).

Entretanto, segue no Anexo 5 a descrição da metodologia utilizada para a identificação dos cocos aeróbios pois são estes os microrganismos mais freqüentemente isolados dos canais radiculares necróticos, conforme os estudos de ZAVISTOSKI et al. (1980), KANNANGARA; THADEPALLI; McQUIRTER (1980), BROOK; GRIMM; KIELICH (1981), ADERHOLD; KNOTHE; FRENKEL (1981), VON KONOW; NORD; NORDENRAN (1981) e LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983).

4.2.2. Pesquisa de bactérias anaeróbias:

O agar sangue para cultura anaeróbia corresponde a uma base de Brucella agar com 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Sobre o inóculo semeado, depositou-se dois discos impregnados, respectivamente, com 5ug de metronidazol e 10ug de gentamicina, porque os anaeróbios são, em geral, sensíveis ao metronidazol e resistentes à gentamicina. Desta forma, este meio permite o crescimento de anaeróbios em geral. Quanto ao meio BBE, é seletivo e indicador de *Bacteroides fragilis*.

Os meios básicos após a semeadura foram incubados a 37°C, durante 48 horas, em jarra de anaerobiose, sendo utilizado como gerador de CO₂ o sistema BBL ou Probac. A

jarra de anaerobiose BBL é de resina plástica (policarbonato) transparente e deve ser usada com um sistema químico GasPak ou equivalente. O sistema GasPak possui catalisador (paládio) e envelope gerador de hidrogênio mais dióxido de carbono na presença de 10ml de água. A jarra, após carregada, é fechada hermeticamente e colocada na incubadora. As condições anaeróbias produzidas no sistema são induzidas quando a água é adicionada no interior do envelope GasPak para formar hidrogênio, que reage com o oxigênio atmosférico na presença de catalisador paládio, formando água (FIG. 9).



FIGURA 9 - Jarra anaeróbia de resina plástica transparente (BBL) e sistema químico Probac.

O controle interno da atmosfera de anaerobiose da jarra foi feito com um papel de filtro embebido em azul de metileno. Esse indicador, em baixo potencial de oxirredução, isto é, quando o meio está reduzido, a sua cor original é alterada para o incolor.

Na placa de BBE, o crescimento em presença de 20% de bile e a hidrólise da esculina revelada pelo enegrecimento do meio, fornece evidência presuntiva do grupo *Bacteroides fragilis*.

A partir do agar sangue, foi observada a morfologia colonial com auxílio de microscópio estereoscópio (IMPAC- Tokio). As colônias foram repicadas (com fio de platina), sem perda de tempo, para tubos com 5ml de tioglicolato (previamente regenerado e suplementado com 0,2ml de solução de bicarbonato de sódio 2% e 0,2ml de soro de cavalo). Os tubos foram incubados a 37°C, durante 24 horas em atmosfera convencional e do crescimento foi feito Gram. A observação dos germes presentes foi realizada pela equipe técnica do setor de bacteriologia do laboratório Weinmann. Para a identificação dos microrganismos foram realizadas, a partir dos resultados obtidos, provas bioquímicas conforme métodos convencionais (CAUDURO; MEZZARI (1989), BARTH; MATUSIAK (1995) e MURRAY (1995)). No Anexo 6 está descrita a rotina de identificação utilizada assim como no Anexo 7 encontra-se a descrição dos meios de cultura (CAUDURO; MEZZARI (1989)).

5. RESULTADOS:

O resultado da cultura bacteriológica para aeróbios e anaeróbios foi negativo em cinco dentes (45,5%). Obtiveram resultado negativo todas as culturas que não cresceram no tioglicolato, nem posteriormente nos meios sólidos, somando um total de 96 horas de incubação.

Em uma amostra identificamos cultura mista com a presença de *Staphylococcus* sp. coagulase negativo e *Peptostreptococcus* sp.. Cabe ressaltar que a presença desses dois microrganismos (um aeróbio e um anaeróbio) foi o suficiente para considerá-la continente de cultura mista.

Peptostreptococcus sp., *Enterococcus faecalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus* sp. grupo viridans foram isolados como cultura pura nos outros cinco dentes amostrados.

A seguir segue a descrição individual dos casos examinados (documentação comprobatória vide Anexo 8):

Paciente nº 1: Paciente do sexo masculino, 38 anos, apresentando dor espontânea, contínua, de alta intensidade e localizada no dente 28. A coroa do dente em questão apresentava-se restaurada e ao exame radiográfico não foi constatada qualquer alteração periapical. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão, percussão e digitação apical. Havia edema na região periapical e odor fétido.

Resultados: Aeróbios: negativo

Anaeróbios: negativo

Paciente nº 2: Paciente do sexo feminino, 32 anos, apresentando dor espontânea, intermitente, de alta intensidade e localizada no dente 22. A coroa do dente em questão apresentava-se restaurada e ao exame radiográfico não foi constatada qualquer alteração periapical. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão e percussão. O teste de sensibilidade à digitação apical foi negativo. Não foi constatado edema na região periapical nem odor fétido.

Resultados: Aeróbios: *Staphylococcus* sp. coagulase negativo

Anaeróbios: *Peptostreptococcus* sp.

Paciente nº 3: Paciente do sexo feminino, 25 anos, apresentando dor espontânea, intermitente, de média intensidade e localizada no dente 11. A coroa do dente em questão apresentava-se cariada e ao exame radiográfico foi constatada a presença de lesão radiolúcida periapical de 0,5cm de diâmetro. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão e percussão. O teste de sensibilidade à digitação apical foi negativo. Não foi constatado edema na região periapical nem odor fétido.

Resultados: Aeróbios: negativo

Anaeróbios: *Peptostreptococcus* sp.

Paciente nº 4: Paciente do sexo feminino, 17 anos, apresentando dor espontânea, contínua, de alta intensidade e localizada no dente 27. A coroa do dente em questão apresentava-se cariada e ao exame radiográfico foi constatada a presença de um aumento do espaço periodontal apical na raiz palatina e méso-vestibular. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão, percussão e digitação apical. Havia edema na região periapical e odor fétido muito acentuado após a abertura da câmara pulpar.

Resultados: Aeróbios: *Enterococcus faecalis*

Anaeróbios: negativo

Paciente nº 5: Paciente do sexo feminino, 32 anos, apresentando dor espontânea, contínua e de alta intensidade e localizada no dente 14. A coroa do dente em questão apresentava-se cariada e ao exame radiográfico não foi constatada qualquer alteração periapical. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão, percussão e digitação apical. Não foi constatado edema na região periapical nem odor fétido.

Resultados: Aeróbios: negativo

Anaeróbios: negativo

Paciente nº 6: Paciente do sexo feminino, 14 anos, apresentando dor espontânea, contínua e de alta intensidade e difusa. A coroa do dente 46 apresentava-se cariada e ao exame radiográfico foi constatada lesão radiolúcida periapical na raiz distal e mesial, com um diâmetro de 0,3mm em cada. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão, percussão e digitação apical. Não foi constatado edema na região periapical, mas foi constatada a presença de odor fétido.

Resultados: Aeróbios: negativo

Anaeróbios: *Fusobacterium nucleatum*

Paciente nº 7: Paciente do sexo feminino, 57 anos, apresentando dor espontânea, contínua e de média intensidade e localizada no dente 11. A coroa do dente em questão apresentava-se cariada e ao exame radiográfico foi constatado lesão radiolúcida periapical

de 0,5cm de diâmetro. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à percussão e digitação apical. Não foi constatada sensibilidade à pressão. Havia edema na região periapical e odor fétido.

Resultados: Aeróbios: *Streptococcus agalactiae*

Anaeróbios: negativo

Paciente nº 8: Paciente do sexo masculino, 25 anos, apresentando dor espontânea, contínua, de alta intensidade e localizada no dente 11. A coroa do dente em questão apresentava-se restaurada e ao exame radiográfico foi constatada a presença de lesão periapical em torno de 1cm de diâmetro. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão, percussão e digitação apical. Havia edema na região periapical e odor fétido no momento da abertura da câmara pulpar.

Resultados: Aeróbios: negativo

Anaeróbios: negativo

Paciente nº 9: Paciente do sexo feminino, 17 anos, apresentando dor espontânea, contínua, de alta intensidade e localizada no dente 22. A coroa do dente em questão apresentava-se cariada e ao exame radiográfico não foi constatada qualquer alteração periapical. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão e percussão. O teste de sensibilidade à digitação apical foi negativo. Não foi constatado edema na região periapical nem odor fétido.

Resultados: Aeróbios: *Streptococcus* sp. grupo viridans

Anaeróbios: negativo

Paciente nº 10: Paciente do sexo feminino, 48 anos, apresentando dor espontânea, contínua, de alta intensidade e localizada no dente 44. A coroa do dente em questão apresentava-se restaurada e ao exame radiográfico foi constatada a presença de lesão radiolúcida periapical de 1cm de diâmetro. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão, percussão e digitação apical. Havia edema na região periapical, mas não foi constatada a presença de odor fétido.

Resultados: Aeróbios: negativo

Anaeróbios: negativo

Paciente nº 11: Paciente do sexo masculino, 53 anos, apresentando dor espontânea, contínua, de alta intensidade e localizada no dente 42. A coroa do dente em questão apresentava-se cariada e ao exame radiográfico não foi constatada qualquer alteração periapical. O teste de vitalidade pulpar foi negativo e o dente estava sensível à pressão e percussão. O teste de sensibilidade à digitação apical foi positivo. Não foi constatado edema na região periapical nem odor fétido.

Resultados: Aeróbios: negativo

Anaeróbios: negativo

Os dados, acima descritos, estão dispostos na Tabela 1.

A ocorrência dos grupos bacterianos, nos casos de cultura positiva, está disposta na Tabela 2.

TABELA 1

Ordenação dos pacientes examinados e dos resultados obtidos:

| Paciente | Sexo/ Idade | Dente | Estado da Coroa | R X Periapical | Dor Espontânea | Dor à Percussão | Dor à Pressão | Edema | Sensibilidade à Digitação Apical | Odor Fétido | Identificação: a) Aeróbios b) Anaeróbios |
|----------|----------------|-------|--------------------|--|-------------------|--------------------|------------------|-------|--|----------------|--|
| 1 | M/38 | 28 | restaurada | sem alteração | + | + | + | + | + | + | a) Negativa b) Negativa |
| 2 | F/32 | 22 | restaurada | sem alteração | + | + | + | - | - | - | a) <i>Staphylococcus</i> sp. coagulase - b) <i>Peptostreptococcus</i> sp. |
| 3 | F/25 | 11 | cariada | lesão periapical | + | + | + | - | - | - | a) Negativa b) <i>Peptostreptococcus</i> sp. |
| 4 | F/17 | 27 | cariada | aumento do es- paço periodon- tal apical | + | + | + | + | + | ++ | a) <i>Enterococcus faecalis</i> b) Negativa |
| 5 | F/32 | 14 | cariada | sem alteração | + | + | + | - | + | - | a) Negativa b) Negativa |
| 6 | F/14 | 46 | cariada | lesão periapical | + | + | + | - | + | + | a) Negativa b) <i>Fusobacterium nucleatum</i> |
| 7 | F/57 | 11 | cariada | lesão periapical | + | + | - | + | + | + | a) <i>Streptococcus agalactiae</i> b) Negativa |

| | | | | | | | | | | | |
|----|------|----|------------|------------------|---|---|---|---|---|---|--|
| 8 | M/25 | 11 | restaurada | lesão periapical | + | + | + | + | + | + | a) Negativa b) Negativa |
| 9 | F/17 | 22 | cariada | sem alteração | + | + | + | - | - | - | a) <i>Streptococcus</i> sp. grupo viridans b) Negativa |
| 10 | F/48 | 44 | restaurada | lesão periapical | + | + | + | + | + | - | a) Negativa b) Negativa |
| 11 | M/53 | 42 | cariada | sem alteração | + | + | + | - | + | - | a) Negativa b) Negativa |

TABELA 2

Ocorrência dos grupos bacterianos nos casos de cultura positiva:

| Grupo Bacteriano | Número de casos |
|-----------------------------------|------------------------|
| Cocos aeróbios Gram-positivos | 4 |
| Cocos anaeróbios Gram-positivos | 2 |
| Bacilos anaeróbios Gram-negativos | 1 |

6. DISCUSSÃO:

O estudo bacteriológico das infecções endodônticas possui inúmeras dificuldades a ele inerentes. Esse tipo de experimento exige uma metodologia muito criteriosa, que deve ser seguida com os necessários cuidados para evitar a contaminação pela microbiota normal da cavidade bucal. Observamos que a metodologia usada em diversos estudos apresenta variações, incluindo a técnica de coleta, o meio de transporte, os meios de cultura, os tipos de incubação e os métodos de identificação.

A seleção dos pacientes que participaram deste estudo foi realizada com rigorosa metodologia. Todos os pacientes eram portadores de periapicopatias agudas. O estudo bacteriológico dos processos agudos periapicais também foi realizado por SABISTON; GRIGSBY; SEGERSTROM (1976), ZAVISTOSKI et al. (1980), GRIFFEE et al. (1980), ATTEBERY; KIMURA; CARROL (1980), BROOK; GRIM; KIELICH (1981), OGUNTEBI et al. (1982), HAAPASALO et al. (1986), LEWIS; MacFARLANE; McGOWAN (1986), YOSHIDA et al. (1987), HAAPASALO (1989), BROOK; FRAZIER; GHER (1991), HASHIOKA et al. (1992), VAN WINKLHOFF; VAN STEENBERGEN; GRAAFF (1992), FICHER; RUSSEL (1993), GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b).

Outros autores não se detiveram no aspecto do estado agudo do caso selecionado e sim estudaram os canais radiculares necróticos de um modo geral. Dentre eles estão KANTZ; HENRY (1974), GOODMAN (1977), MÖLLER (1981), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1981), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1983), MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990), ASSED et al. (1996) e SYDNEY; ESTRELA (1996).

Em oposição, alguns autores estudaram patologias agudas sem determinar a origem das mesmas, como SABISTON; GOLD (1974), ADERHOLD; KNOTHE; FRENKEL (1981) e HEIMDAHL et al. (1995). Não concordamos com esses autores porque os mesmos avaliaram microbiologicamente processos infecciosos agudos de origem periodontal e periapical de maneira global, desconsiderando as diferenças inerentes de cada patologia.

Por outro lado, nos estudos de KANNANGARA; THADEPALLI; McQUIRTER (1980), VON KONOW; NORD; NORDENRAM (1981) LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983), VAN WINKLHOFF; CARLEE; GRAAFF (1985) as diferentes causas das patologias agudas foram determinadas, porém a análise dos dados também não respeitou a individualidade de cada patologia.

Um exemplo é o estudo de KANNANGARA; THADEPALLI; McQUIRTER (1980), os quais incluíram nos seus experimentos infecções pós-traumáticas de mandíbula com fratura, abscessos dentários, osteomielite de mandíbula, infecção pós-extração, infecção submandibular e de tecidos moles.

Ainda outro exemplo é o estudo de LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983) onde as causas dos abscessos orofaciais foram divididas em odontogênicas (infecções pulpares, periodontais ou pericoronarites), pós-operatórias (infecções decorrentes de procedimentos de exodontia), fraturas e lesões de pele (furúnculos).

Conforme citado, os autores agruparam processos patológicos de etiologias marcadamente diferentes. O propósito desses estudos difere do propósito do presente experimento, pois acreditamos que o local de origem de cada patologia, por apresentar características próprias e peculiares, não pode ser simplesmente ignorado.

Os pacientes que participaram do presente experimento também não tinham sido submetidos à terapia antimicrobiana prévia bem como nos estudos de BROOK; GRIM; KIELICH (1981), OGUNTEBI et al. (1982), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983), LEWIS; MacFARLANE; McGOWAN (1986), HAAPASALO et al. (1986), SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989), HAAPASALO (1989), HASHIOKA et al. (1992), SUNDQVIST (1992), FICHER; RUSSEL (1993), BRAUNER; CONRADS (1995) e NODA; INOUE; KOMATSU (1999). Esse aspecto foi considerado relevante pois acreditamos que a terapia antimicrobiana prévia possa influir reduzindo ou eliminando os microrganismos da amostra e, por conseqüência, dificultar o processo de isolamento e identificação dos mesmos.

Tratando-se da coleta do material, acreditamos que o *swab* não é a forma mais adequada de coleta para os exames microbiológicos da cavidade bucal, pois apresenta grande possibilidade de contaminação com a microbiota bucal indígena. Em oposição a nossa assertiva, VAN WINKELHOF; CARLEE; GRAAFF (1985) coletaram as amostras após a incisão do abscesso com *swab*. Na década de 90, BROOK; FRAZIER; GHER (1991) realizaram esse procedimento através da aspiração com seringa e agulha estéreis ou com *swab*, durante a incisão e drenagem do abscesso.

Por sua vez, KANNANGARA; THADEPALLI; McQUIRTER (1980) coletaram o material para o exame microbiológico de diferentes formas: aspiração com agulha e seringa no local da infecção, pus drenado cirurgicamente ou drenado a partir de fistulas externas e fragmentos necróticos de tecido ósseo. Como citado anteriormente, o trabalho dos autores

acima difere da maneira como foi feita a seleção de casos do presente experimento. Os autores variaram, no mesmo estudo, não só as técnicas de coleta como também o material da amostra.

Vários estudos foram feitos através da aspiração do exsudato inflamatório, diretamente no edema, com agulha e seringa estéreis (SABISTON; GOLD (1974), ATTEBERY; KIMURA; CARROL (1980), BROOK; GRIMM; KIELICH (1981), ADERHOLD; KNOTHE; FRENKEL (1981), VON KONOW; NORD; NORDENRAN (1981), OGUNTEBI et al. (1982), LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983), HEIMDHAL et al. (1985), LEWIS; McFARLANE; McGOWAN (1986)).

Ainda nessa forma de coleta, há a variação no local da aspiração. Estudos como o de ATTEBERY; KIMURA; CARROL (1980) registraram que a coleta foi tomada do edema bucal com agulha e seringa estéreis. Em oposição, OGUNTEBI et al. (1982), LEWIS; McFARLANE; McGOWAN (1986) entre outros, coletaram do edema intra-bucal.

As amostras dos experimentos de ADERHOLD; KNOTHE; FRENKEL (1981), VON KONOW; NORD; NORDENRAN (1981), LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983) e HEIMDHAL et al. (1985) foram coletadas através da aspiração do exsudato de ambas as maneiras (intra-bucal ou extra-bucal).

Independente do local onde foi feita a aspiração, é axiomático que o material deve ser coletado onde o organismo suspeito é mais freqüentemente encontrado e com a menor possibilidade de contaminação externa quanto possível. Considerando que o nosso experimento é restrito aos processos periapicais agudos e que a fonte de infecção de tais patologias se encontra dentro do canal radicular, julgamos mais adequado a coleta do material do interior do mesmo em oposição aos autores que aspiraram o material diretamente no abscesso. A grande

dificuldade dessa técnica é a pequena quantidade de material que muitas vezes é encontrada no interior do canal radicular, para o exame microbiológico. Apesar da dificuldade, optamos por essa técnica de amostragem.

Entretanto, existem autores que preferem examinar microbiologicamente os processos periapicais agudos a partir do material aspirado com agulha e seringa no local do abscesso, tais como ATTEBERY; KIMURA; CARROL (1980), BROOK; GRIMM; KIELICH (1981), OGUNTEBI et al. (1982), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983) e LEWIS; McFARLANE; McGOWAN (1986).

Por outro lado, SABISTON; GRIGSBY; SEGERSTROM (1976) coletaram o material associando duas formas diferentes: através da aspiração do exsudato ou com o uso de um cone de papel no interior do canal radicular. Acreditamos que a seleção dos casos é fundamental para a determinação de uma forma criteriosa e unânime de coleta, contemplando sempre o local de origem do processo infeccioso.

Ilustrando a diversidade no assunto, citamos WEIGER et al. (1995) que compararam a microbiota dos canais radiculares e do trato fistuloso de dentes necróticos. Para tanto, os autores usaram pontas de papel absorventes para a coleta do material, tanto do interior do canal radicular como do trato fistuloso. Os autores concluíram que uma variedade de microrganismos é capaz de realizar a colonização endodôntica e induzir a lesões extrarradiculares clinicamente caracterizadas por fistulas.

Essa técnica de amostragem é válida a título de comparação entre a microbiota dos canais radiculares e do trato fistuloso de dentes necróticos. Acreditamos que a coleta de material do interior da fístula é muito suscetível à contaminação pela microbiota bucal indígena

e dessa forma não poderia ser indicada como única forma de amostragem de infecções endodônticas.

A coleta do material presente nos canais radiculares experimentais foi realizada por meio de um cone de papel absorvente estéril pré-autoclavado, tal qual nos estudos de BERGENHOLTZ (1974), GOODMAN (1977), ZAVISTOSKI et al. (1980), GRIFFEE et al. (1980), HAAPASALO et al. (1986), HAAPASALO (1989), HASHIOKA et al. (1992), FICHER; RUSSEL (1993), GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994), KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGOPOLOU (1995), ASSED et al. (1996), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b) e NODA; INOUE; KOMATSU (1999).

Nos estudos que realizaram as coletas com cone de papel, bem como no presente experimento, foi observado o cuidado em excluir os dentes que não eram passíveis de isolamento absoluto, tal qual ZAVISTOSKI et al. (1980), YOSHIDA et al. (1987), HASHIOKA et al. (1992), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b) e NODA; INOUE; KOMATSU (1999). Esse procedimento, além de isolar o dente da cavidade bucal, minimiza a produção de aerossol de saliva e sangue contaminado, os quais comprometem uma amostragem fiel que isole apenas os microrganismos envolvidos com as patologias periapicais agudas.

Além disso, a câmara pulpar dos dentes experimentais estava fechada, sem exposição ao meio bucal assim como nos estudos de HAAPASALO et al. (1986), HAAPASALO (1989), HASHIOKA et al. (1992) e WEIGER et al. (1995). Os dentes cuja câmara pulpar estivesse aberta, permitindo a entrada de saliva para a cavidade pulpar, foram excluídos, pois objetivamos exclusivamente o isolamento da microbiota do canal radicular.

Por fim, os dentes não apresentavam qualquer intervenção endodôntica prévia (tratamento endodôntico, atendimento de urgência ou tratamento conservador da polpa) assim como nos experimentos de HAAPASALO et al. (1986), HAAPASALO (1989), HASHIOKA et al. (1992) e WEIGER et al. (1995). Esse aspecto foi considerado, visto que uma intervenção prévia poderia ocasionar uma redução ou até mesmo um aumento do número de microrganismos. Por exemplo, um procedimento séptico e/ou uma restauração provisória mal adaptada contribui para o aumento do número de bactérias no canal radicular. Enfim, também esse aspecto foi considerado para descartarmos o risco de isolamento de bactérias não relacionadas diretamente com as periapicopatias agudas.

Em suma, tais exigências foram criteriosamente seguidas com o objetivo de isolarmos os microrganismos relacionados com a etiopatogenia dos processos periapicais agudos, sem que ocorressem contaminações com a microbiota bucal indígena.

Dentes monorradiculares e polirradiculares foram incluídos na amostra bem como nos estudos de GRIFFEE et al. (1980), MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b), e NODA; INOUE; KOMATSU (1999).

Os dentes apresentavam-se cariados e restaurados como no estudo de GRIFFEE et al. (1980). Os dentes traumatizados somente não foram incluídos no presente estudo pelo simples fato de não termos encontrado um caso que preenchesse todas as exigências citadas anteriormente.

Nos dentes polirradiculares, optou-se por coletar o material exclusivamente do canal radicular mais amplo, conforme realizado por GRIFFEE et al. (1980), evitando-se assim a

necessidade de uma instrumentação prévia dos outros canais mais atrésicos, antes da amostragem. Além disso, não constatamos no experimento desses dentes, um canal que se diferenciasse dos demais por abundância de exsudato. Salientamos esse aspecto, pois foi o critério adotado por NODA; INOUE; KOMATSU (1999), os quais optaram pela coleta do material no canal radicular em que o exsudato estivesse mais abundante.

Em relação ao número de amostras, verificamos grande diversidade nos artigos consultados. Amostras em torno de 30 dentes foram usadas pelos autores: KANTZ; HENRY (1974), GRIFFEE et al. (1980), FABRICIUS et al. (1982), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1983), VAN WINKLHOFF; CARLEE; GRAAFF (1985), YOSHIDA et al. (1987), PANTERA; ZAMBON; SHIH-LEVINE (1988), FUKUSHIMA et al. (1990), BROOK; FRAZIER; GHER (1991), HASHIOKA et al. (1992), GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994), ASSED et al. (1996), SYDNEY; ESTRELA (1996) e NODA; INOUE; KOMATSU (1999).

Por outro lado, amostras em torno de 50 dentes foram usadas pelos pesquisadores: KEUDELL et al. (1976), GOODMAN (1977), ADERHOLD; KNOTHE; FRENKEL (1981), VON KONOW; NORD; NORDENRAN (1981), LABRIOLA; MASCARO; LAPERT (1983), HEIMDAHL et al. (1985), LEWIS; McFARLANE; McGOWAN (1986) e FICHER; RUSSEL (1993).

Ilustrando ainda mais a diversidade, amostras em torno de 60 dentes foram usadas nos seguintes experimentos: BERGENHOLTZ (1974), SABISTON; GRIGSBY; SEGERSTROM (1976), KANNANGARA; THADEPALLI; McQUIRTER (1980), MÖLLER et al. (1981), HAAPASALO et al. (1986), HAAPASALO (1989), SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN

(1989), SUNDQVIST (1992), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b).

O presente estudo, por apresentar tantos critérios de exclusão na seleção dos casos e pela exigüidade de tempo, foi realizado em onze dentes. Outros estudos também foram feitos com amostras pequenas (entre oito a doze dentes): SABISTON; GOLD (1974), ZAVISTOSKI et al. (1980), BROOK; GRIM; KIELICH (1981), OGUNTEBI et al. (1982), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983) e WEIGER et al. (1995). Esse tamanho de amostra inviabiliza uma análise estatística dos resultados. Nas pesquisas microbiológicas, porém, os resultados também podem apresentar grande valor quando analisados individualmente.

A cavidade bucal apresenta como microbiota normal mais de 350 espécies bacterianas (BAUMGARTNER (1997)). Sendo assim, a metodologia das pesquisas de infecções pulpares deve garantir o isolamento das bactérias do canal radicular sem haver contaminação com a microbiota bucal normal. Dessa forma fez-se necessário o isolamento absoluto do campo operatório, conforme enfatizado anteriormente, e uma desinfecção prévia do dente, lençol de borracha e grampo.

No presente experimento, foi utilizada uma aplicação inicial de solução de iodo-etanol 5% e etanol 70% (um a dois minutos antes da manipulação), tal como anteriormente utilizada por HASHIOKA et al. (1992). Usamos o iodo-etanol 5%, pois, segundo TORTAMANO (1991), os derivados do iodo são os anti-sépticos e desinfetantes mais eficazes para a Odontologia. Isso ocorre devido ao espectro germicida de tais substâncias que incluem todas as formas de patógenos vegetativos (bactérias, vírus, fungos e protozoários). Os esporos são mais resistentes, mas são inativados por um período de exposição mais prolongado. Junto a isso, associamos o

etanol 70%, pois, segundo TORTAMANO (1991), os álcoois são bactericidas de baixa potência a todas as bactérias patogênicas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas e para o bacilo da tuberculose. O etanol tem melhor eficácia em concentrações abaixo de 70%, pois sua ação desnaturante e precipitante exige a presença de água para a manifestação do efeito.

Com relação à desinfecção inicial, os autores GRIFFEE et al. (1980), SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989) e HAAPASALO (1989) adotaram a técnica de desinfecção prévia à amostragem microbiológica utilizada por Möller (1966)⁴. Esses autores realizaram tal procedimento com H₂O₂ 30% e tintura de iodo 2% que foi desativada com tiosulfato de sódio 5%, apud GRIFFEE et al. (1980).

Os autores BYSTRÖN; SUNDQVIST (1983) realizaram a desinfecção conforme Möller (1966)⁴, porém usando tintura de iodo 5%, assim como MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990). Derivados do iodo também foram usados por KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGPOLOU (1995) que utilizaram tintura de iodo 5% e solução de álcool 10%.

Verificamos que as variações são freqüentes ao longo de cada estudo. GOODMAN (1977) optou pelo uso de Betadine e, após, álcool isopropil, enquanto que ZAVISTOSKI et al. (1987) utilizaram quatro aplicações de merthiolate seguido de uma lavagem de hipoclorito de sódio a 5,25%. Por outro lado, KANTZ; HENRY (1974) desinfetaram o dente e o lençol de borracha com mercocresol.

A clorexidina também é freqüentemente empregada nos procedimentos de desinfecção. HAAPASALO et al. (1986) utilizaram para desinfecção H₂O₂ 10% e 0,5% de gluconato de clorexidina em etanol 70%. Solução de gluconato de clorexidina a 0,5% também foi usada nos estudos de GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e

⁴MÖLLER (1966), apud GRIFFEE et al. (1980) descrito anteriormente na página 4.

GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b). Ainda, WEIGER et al. (1995), que fizeram a amostragem a partir do canal radicular e do interior de fistulas, usaram digluconato de clorexidina 0,2%. A desinfecção foi realizada no lençol de borracha e no dente (para a amostragem do interior do canal radicular) e na gengiva, mucosa e entrada da fistula (para amostragem do trato fistuloso).

Os tipos de desinfetantes variam de estudo para estudo, embora exista um consenso sobre a adoção de um procedimento de desinfecção inicial, como forma de garantir uma amostra sem contaminação.

Julgamos desnecessário o uso de testes para averiguar a presença de microrganismos na superfície do dente ou lençol de borracha como realizado por ZAVISTOSKI et al. (1980), BYSTRÖM; SUNDQVIST (1981), BYSTRÖM; SUNDQVIST (1983) e MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990). Isso porque confiamos no procedimento de desinfecção usado em nosso experimento, bem como os autores KANTZ; HENRY (1974), GOODMAN (1977), GRIFFEE et al. (1980), HAAPASALO et al. (1986), SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989) e HAAPASALO (1989), HASHIOKA et al. (1992), SUNDQVIST (1992), GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994), KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGOPOLU (1995), WEIGER et al. (1995), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b) que também não realizaram o teste microbiológico da superfície do dente ou lençol de borracha.

Acreditamos que o uso de gás anaeróbico (gás de nitrogênio ou associações do mesmo com hidrogênio e dióxido de carbono) que alguns autores usaram durante a amostragem (KANTZ; HENRY (1974), YOSHIDA et al. (1987), FUKUSHIMA et al. (1990), e HASHIOKA

et al. (1992)) possa ser um recurso adicional para o isolamento de anaeróbios, porém não o consideramos indispensável.

Segundo CARLSSON; FRÖLANDER; SUNDQVIST (1977), o uso de meios de cultura suplementados com sangue durante várias fases do processamento do espécime pode ser mais importante para o alto isolamento das bactérias anaeróbias em pesquisas clínicas do que medidas feitas para minimizar a exposição do espécime ao ar.

Em relação ao meio de transporte empregado, também existem variações de um estudo para outro. Estes meios têm por finalidade a preservação dos microrganismos presentes no material amostrado, desde a sua colheita até o adequado processamento no laboratório.

O fluido de transporte reduzido (RTF) foi utilizado para colocação do material coletado do interior dos canais radiculares nos experimentos de KANTZ; HENRY (1974), FISCHER; RUSSEL (1993), KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGPOLOU (1995) e ASSED et al. (1996). Já no estudo de FUKUSHIMA et al. (1990), o fluido de transporte reduzido (RTF) foi empregado para o transporte de dentes extraídos.

KANTZ; HENRY (1974) além de usarem o RTF como meio de transporte para a incubação em anaerobiose, usaram o tioglicolato como meio de transporte para a incubação em aerobiose.

Por outro lado, GOODMAN (1977) avaliou a solução de Stuart como meio de transporte dos espécimes coletados de canais radiculares necróticos. O pesquisador foi capaz de isolar e identificar o mesmo espectro predominante de bactérias relatado por outros autores que utilizaram a rígida técnica do Instituto Politécnico da Virgínia (VPI).

Com base nas técnicas do Laboratório de Anaerobiose do Instituto Politécnico da Virgínia (VPI), KEUDELL et al. (1976) colocaram o cone de papel amostrado diretamente em um tubo com levedura peptona (PY), que foi incubado por quatro horas a 37°C. Uma porção dessa amostra de levedura peptona, previamente incubada, foi espalhada na superfície de um *roll tube* anaeróbico e placas de agar sangue, incubados a 37°C.

MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990), transportaram as pontas de papel amostradas em um meio de manutenção microbiostático (VMGA III Viability Maintaining Microbiostatic Medium).

Por sua vez, WEIGER et al. (1995) colocaram os cones de papel amostrados em um tubo contendo meio de coração e cérebro anaeróbico pré-reduzido estéril para o transporte do espécime até o laboratório.

Entre os autores que coletaram material por aspiração do exsudato há também diferenças nos meios de transporte utilizados. Por exemplo, WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983) transportaram o pus aspirado em um meio de transporte anaeróbico pré-reduzido de Williams e colaboradores.

Nos experimentos de OGUNTEBI et al. (1985), HEIMDAHL et al. (1985) e BROOK; FRAZIER; GHER (1991) o material foi transportado na própria seringa selada com um bloco de borracha.

Já, VAN WINKLHOFF; CARLEE; GRAAFF (1985) transportaram as amostras em meio sólido de carvão.

Concordamos que, quando realizada a coleta do material por aspiração com seringa e agulha estéreis, a própria seringa é um excelente meio de transporte. Isso é possível desde que

seja expelido o máximo possível de ar do interior da seringa e fixado o êmbolo com esparadrapo, vedando-se a agulha com uma rolha estéril. Consideramos, inclusive, essa a técnica de coleta ideal para anaeróbios. Entretanto, em nosso experimento, como já justificado anteriormente, optamos pela coleta do material do interior do canal radicular. Dessa forma ficamos limitados ao material de amostragem do seu interior que, normalmente, não é suficiente (no mínimo 1/2ml de exsudato purulento) para uma amostragem adequada por meio da aspiração.

Assim, no presente experimento, o cone de papel amostrado foi imediatamente colocado em um tubo com tampa rosca contendo tioglicolato 135C BBL suplementado com hemina e vitamina K₁, regenerado imediatamente antes do uso.

Segundo FINEGOLD; BARON (1986), o tioglicolato 135C BBL suplementado com hemina (5ug/ml), vitamina K₁ (0,1ug/ml) e bicarbonato de sódio (1mg/ml) é o melhor meio de cultura para anaeróbios, por isso escolhemos esse tioglicolato para o transporte do material coletado. No nosso estudo, o meio de transporte foi usado também como cultivo inicial.

O nosso objetivo na cultura inicial é o desenvolvimento de bactérias de diversos gêneros em um mesmo meio de cultura, contemplando aeróbios e anaeróbios. A decisão do uso do tioglicolato como meio de transporte e cultura inicial recai no fato de ser um meio nutricionalmente rico e indicado para o cultivo de bactérias anaeróbias.

A técnica que usamos já foi avaliada anteriormente. Em 1980, CARLSSON; SUNDQVIST avaliaram cinco diferentes métodos de transporte e cultura de bactérias de canais radiculares infectados. Quando o meio fluido de tioglicolato USP (BBL) e meio Clausen (Oxoid) foram usados para o transporte, bem como para a cultura inicial, as bactérias foram

encontradas em 58% e 47% dos espécimes, respectivamente. A recuperação de bactérias pelo meio fluido de tioglicolato foi melhor quando comparada com a do elaborado meio PRAS. O meio fluido de tioglicolato USP, em um frasco com tampa rosca, não exige qualquer equipamento especial na clínica odontológica e é recomendado, segundo os autores, para uso rotineiro na prática dentária.

Em nosso experimento, isolamos microrganismos em seis (54,5%) dos onze casos analisados. Esses achados podem estar de acordo com CARLSSON; SUNDQVIST (1980), mas revelam ainda um alto percentual de culturas negativas.

Em nosso estudo, encontramos culturas negativas em cinco casos amostrados (45,5%). Também encontraram culturas negativas em seus experimentos os autores KEUDELL et al. (1976) 21%, BERGENHOLTZ (1974) 36%, ASSED et al. (1996) 4%, SABISTON; GRIGSBY; SEGERSTROM (1976) 10%, KANNANGARA; THADEPALLI; McQUIRTER (1980) 11%, GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994) 10%, GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b) 14%.

Os autores citados encontraram um percentual de culturas negativas, no máximo de 36%. No nosso experimento o percentual foi de 45,5%. Essa diferença no percentual de culturas negativas indica que a técnica que utilizamos pode não ter sido suficientemente sensível para o isolamento dos microrganismos habitantes no canal radicular.

O tioglicolato pode ser usado dentro de um tubo com tampa rosca sem a necessidade de equipamentos especiais, mas apresenta limitações. As bactérias anaeróbias estritas são incapazes de crescerem em tal meio, pois são extremamente sensíveis ao oxigênio.

A técnica da cultura inicial em tioglicolato, adotada nesse estudo, não favorece igualmente o crescimento de todos os microrganismos. Após um período de incubação, microrganismos que crescem mais lentamente podem ficar em desvantagem populacional quando comparados com microrganismos de crescimento rápido.

Encontramos cultura mista (aeróbio e anaeróbio) em apenas um dos onze casos amostrados (*Staphylococcus* sp. coagulase negativo e *Peptostreptococcus* sp.). Isso difere dos autores que encontraram com maior frequência (KANTZ; HENRY (1974) 57%, GOODMAN (1977) 67%, ZAVISTOSKI et al.(1980) 90%, ADERHOLD; KNOTHE; FRENKEL (1981) 68%, BROOK; GRIM; KIELICH (1981) 33%, LEWIS; MacFARLANE; McGOWAN (1986) 54%, HAAPASALO (1989), FUKUSHIMA et al. (1990) 60% e BROOK; FRAZIER; GHER (1991) 44%).

Embora tenhamos usado uma metodologia muito criteriosa na coleta do material, considera-se que o tioglicolato, por ser um meio muito rico, permite com facilidade o crescimento de bactérias que possam ter contaminado a amostra de maneira indesejável. *Staphylococcus* sp. coagulase negativo isolado no presente estudo poderia ser um contaminante. Encontramos na literatura apenas o estudo de KELDELL et al. (1976) que isolou *Staphylococcus epidermidis*, que é um integrante desse grupo. Sabemos que a microbiota do canal radicular representa um grupo restrito dos microrganismos da microbiota bucal normal. Partindo desse pressuposto, podemos questionar se os microrganismos isolados dos canais radiculares possam ser realmente os patógenos das periapicopatias agudas ou simples contaminantes da amostra. Segundo ANTUNES (1995) a possibilidade de *Staphylococcus* sp. coagulase negativo isolado representar apenas contaminação da amostra pela microbiota

normal do sítio anatômico é uma constante, visto que tais microrganismos estão distribuídos na superfície corporal, pele e mucosas.

Encontramos também *Streptococcus agalactiae*, porém, não localizamos nenhum estudo na literatura que tenha encontrado tal microrganismo em processos periapicais agudos.

Apesar de termos utilizado uma amostra muito pequena, nos parece lícito dizer que a técnica empregada pode não ter sido adequada para se realizar uma descrição da composição bacteriana de periapicopatias agudas, considerando os resultados acima mencionados.

Por sua vez, HAAPASALO et al. (1986), HAAPASALO (1989), GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b) removeram o cone de papel do interior do canal radicular e semearam o material colhido diretamente sobre placas de agar sangue. Esse procedimento apresenta menor possibilidade de crescimento de bactérias contaminantes em relação a técnica da cultura inicial em tioglicolato.

GRIFFEE et al. (1980) realizaram a técnica de amostragem usada por Möller e Sundqvist⁵. O cone de papel amostrado foi esfregado sobre uma placa de agar Schaedler reduzido. Os autores também usaram uma segunda ponta de papel amostrada que foi similarmente colocada dentro de um tubo com tampa rosca, contendo no mínimo 60% caldo de tioglicolato pré-reduzido. O tubo foi incubado aerobicamente com a tampa bem fechada a 37°C, por sete dias ou até o crescimento ser visível.

Os autores também fizeram cultura inicial no tioglicolato, como no nosso experimento, porém incubaram por mais tempo o que tende a permitir o desenvolvimento de bactérias com taxa de crescimento mais lento. Por outro lado, períodos excessivamente longos de incubação

⁵MÖLLER (1966) e SUNDQVIST (1976), apud GRIFFEE et al. (1980) descrito anteriormente na página 4 e 5.

podem permitir também que bactérias contaminantes, originalmente em mínimas quantidades, venham a se desenvolver.

Já BYSTRÖN; SUNDQVIST (1981) e BYSTRÖN; SUNDQVIST (1983) colocaram as pontas amostradas diretamente em um tubo com levedura glicose peptona (PYG) para que o material fosse imediatamente processado. O tubo de PYG com o espécime foi introduzido em uma câmara de anaerobiose para que o mesmo fosse agitado mecanicamente, até que as pontas se desintegrassem. Foram feitas diluições e, a partir das alíquotas obtidas, foram feitas as inoculações. Esse procedimento tem como objetivo promover a dispersão da massa bacteriana amostrada, oferecendo condições de melhor homogeneização.

Nos outros estudos de Sundqvist, foi utilizado um tubo com levedura glicose peptona (PYG) ou um caldo de glicose com carne picada (SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989) e SUNDQVIST (1992)) os quais foram processados antes da semeadura conforme ditam os autores citados no parágrafo anterior.

WEIGER et al. (1985) colocaram as pontas de papel absorvente amostradas em um tubo contendo 1ml de meio de coração e cérebro anaeróbico pré-reduzido estéril. Os autores também usaram a mesma técnica prévia à semeadura inicial. Primeiramente o material coletado é dispersado, após ocorrem diluições do mesmo para que, a partir das alíquotas, sejam realizadas as inoculações.

Esse processo também foi realizado no material que foi transportado no RTF antes das inoculações, nos estudos de KANTZ; HENRY (1974), FISCHER; RUSSEL (1993) e KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGPOLOU (1995).

Ademais, nos experimentos de ZAVISTOSKI et al. (1980), OGUNTEBI et al. (1982), YOSHIDA et al. (1987), MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990) e BRAUNER; CONRADS (1995) a dispersão do material coletado e diluição também foi realizada antes da semeadura inicial.

Os recursos e técnicas que dispomos no estado do Rio Grande do Sul são destinados a pesquisas de microrganismos de importância clínica. As pesquisas bacteriológicas, independentemente do sítio da infecção, são realizadas com o intuito de identificar o patógeno que predomina de maneira característica em uma doença. A identificação desse microrganismo – associada com medidas terapêuticas para a sua eliminação – levam a cura da patologia e, conseqüente, ao sucesso clínico. No entanto, essa técnica pode não ser adequada para estudos mais absolutos de prevalência bacteriana. Dessa forma, tivemos dificuldades em realizar uma metodologia científica que realmente fosse viável para a identificação de todos os microrganismos presentes no canal radicular. Recursos mais sofisticados (câmara de anaerobiose, por exemplo) destinados à pesquisa científica não são encontrados no nosso estado.

Adotamos uma rotina laboratorial preestabelecida, já existente em um laboratório de excelência no nosso estado e adequamos uma metodologia de coleta de material à rotina desse laboratório.

Assim, objetivamos uma investigação científica que fosse facilmente exeqüível a qualquer cirurgião-dentista que necessitasse de um exame microbiológico do seu paciente, embora soubéssemos das limitações inerentes ao procedimento bacteriológico desses estudos.

Em nosso experimento, empregamos para a cultura de microrganismos aeróbios os seguintes meios: agar sangue e MacConkey. O agar sangue, sendo um meio não seletivo, permite o desenvolvimento de um grande número de espécies bacterianas, em razão do valor nutritivo das duas peptonas presentes e do sangue adicionado. Serve, também, para a determinação das reações hemolíticas, que são particularmente importantes para a identificação dos estreptococos.

Esse meio também foi usado nos experimentos de BYSTRÖN; SUNDQVIST (1981), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1983), BROOK; GRIMM; KIELICH (1981), SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989), BROOK; FRAZIER; GHER (1991) e NODA, INOUE e KOMATSU (1999). As placas foram incubadas aerobicamente a 37°C e examinadas 24-48 horas, bem como no presente estudo.

Por sua vez, o MacConkey é um meio seletivo e indicador. A seletividade decorre da presença de sais biliares e cristal violeta, que impedem o desenvolvimento de microrganismos Gram-positivos, selecionando os Gram-negativos.

Também foi usado o meio MacConkey nos experimentos de BROOK; GRIMM; KIELICH (1981) e BROOK; FRAZIER; GHER (1991). As placas foram incubadas aerobicamente a 37°C e examinadas 24-48 horas, bem como no presente estudo.

A cultura de anaeróbios foi feita em agar Bacteróides Bile Esculina (BBE), que é seletivo e diferencial para o grupo *Bacteroides fragilis*, e em agar sangue de Brucella com 5% de sangue desfibrinado de carneiro.

O meio Bacteróides Bile Esculina (BBE) é rotina no laboratório Weinmann e desta forma foi empregado em nosso experimento. Entretanto, é do nosso conhecimento que o grupo

de *Bacteroides fragilis* não é habitante comum em infecções dos canais radiculares. Apenas em infecções dentárias associadas com fraturas mandibulares que fracassaram frente à terapia convencional com penicilina é que devem ser rotineiramente cultivadas para *Bacteroides fragilis*, de acordo com KANNANGARA; THADEPALLI; MCQUIRTER (1980).

Por sua vez, Brucella agar foi usado nos estudos de BROOK; GRIMM; KIELICH (1981), BROOK; FRAZIER; GHER (1991) e MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1999), bem como no presente estudo.

A etapa correspondente à cultura microbiológica exige a utilização de meios ricos em substâncias nutritivas, possuindo fontes de hemina e vitamina K. Tais substâncias em concentrações adequadas permitem o crescimento e multiplicação de microrganismos endodônticos, abrangendo não só aqueles com grande capacidade de síntese como também aqueles exigentes de substâncias nutritivas mais complexas (BAMMANN; ESTRELA (1999)).

Alguns autores utilizaram também, em seus estudos, meios seletivos com kanamicina e vancomicina (GRIFEE et al. (1980), BROOK; GRIMM; KIELICH (1981), HAAPASALO et al. (1986) e HAAPASALO (1989)).

FINEGOLG; BARON (1986) relatam que o agar suplementado com kanamicina e vancomicina é útil para o rápido isolamento de *Bacteroides* sp..

No nosso experimento não isolamos *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp. e nem *Porphyromonas* sp., embora inúmeros autores tenham encontrado tais microrganismos em estudos similares (BERGENHOLTZ et al. (1974), SUNDQVIST et al. , (1979), GRIFEE et al. (1980), ATTEBERY; KIMURA; CARROL (1980), KANNANGARA; THADEPALLI; McQUIRTER (1980), ADERHOLD; KNOTHE; FRENKEL (1981), VON KONOW; NORD;

NORDENRAM (1981), BROOK; GRIM; KIELICH (1981), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1981), FABRICIUS et al. (1982), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1983), LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983), VAN WINKLHOFF; CARLEE; GRAAFF (1985), HAAPASALO et al. (1986), LEWIS; MacFARLANE; McGOWAN (1986), YOSHIDA et al. (1987), PANTERA; ZAMBON; SHIH-LEVINE (1988), HAAPASALO (1989), SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989), MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990), FUKUSHIMA et al. (1990), BROOK; FRAZIER; GHER (1991), BAUMGARTNER (1991), HASHIOKA et al. (1992), BRAUNER; CONRADS (1995), KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGPOLOU (1995), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b)).

Não foi utilizado um meio seletivo com kanamicina e vancomicina, no presente estudo. Entretanto, não parece correto considerar que a falta de um meio seletivo tenha prejudicado o isolamento de determinadas bactérias (*Bacteroides* sp., por exemplo). Um meio seletivo é muito útil quando pode haver uma microbiota mista e há a necessidade de identificar espécies bacterianas específicas. Essa não parece ser a situação encontrada no nosso estudo, visto que obtivemos apenas um caso de flora mista.

Consideramos que talvez o pequeno número de dentes amostrados, e/ou a possível baixa sensibilidade da técnica que empregamos, possam ter contribuído para o não isolamento de *Bacteroides* sp., *Prevotella* sp. e *Porphyromonas* sp.. A técnica que usamos foi sensível apenas para a cultura de um grupo restrito de microrganismos envolvidos com as periapicopatias agudas.

Diferentemente da incubação de aeróbios que não apresenta grandes variações, o processo de incubação de anaeróbios é bem diversificado. A incubação pode ser realizada de três maneiras diferentes: com *roll-tube* (SABISTON; GRIGSBY; SEGERSTROM (1976), KEUDELL et al. (1976) e CARLSSON; SUNDQVIST (1980)); com câmara de anaerobiose (ZAVISTOSKI et al. (1980), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983), HEINDAHL et al. (1985), LEWIS; MacFARLANE; McGOWAN (1986), VON KONOW; NORD; NORDENRAN (1991) e KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGPOLOU (1995)); e com jarra de anaerobiose que foi o método usado no nosso experimento. A atmosfera de anaerobiose é obtida por meio de uma reação química. É usado o kit GasPak ou Probac que possui o catalisador paládio e gerador de hidrogênio mais dióxido de carbono na presença de 10ml de água. A jarra também foi usada nos experimentos de GOODMAN (1977), SABISTON; GRIGSBY; SEGERSTROM (1976), BROOK; GRIMM; KIELICH (1981), VAN WINKLHOFF; CARLEE; GRAAFF (1985), HAAPASALO et al. (1986), HAAPASALO (1989), SUNDQVIST; JOHANSSON; SJÖGREN (1989), MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1999), BROOK; FRAZIER; GHER (1991), WEIGER et al. (1995).

Os métodos mais eficazes para a incubação em atmosfera de anaerobiose é o emprego de *roll-tube* e câmaras de anaerobiose. São métodos sofisticados que não dispomos no Estado. Apesar da jarra de anaerobiose não proteger as bactérias anaeróbias do oxigênio antes da formação da atmosfera de anaerobiose, KILLGORE et al. (1973) e ROSENBLAT et al. (1973), apud BARTH; MATUSIAK (1995) demonstraram que, quando os espécimes clínicos são colhidos e transportados adequadamente, o isolamento de anaeróbios pode ser tão eficaz com o sistema de jarras de anaerobiose como por métodos mais sofisticados.

Outra diferença encontrada nos estudos, além da forma utilizada para a obtenção de uma atmosfera de anaerobiose, é o período de incubação. BROOK; GRIMM; KIELICH (1981) e BROOK; FRAZIER; GHER (1991) incubaram as placas em jarra de anaerobiose com o kit GasPak e examinaram em 48 e 96 horas. Em nosso experimento, bem como o de GOODMAN (1977), o período de incubação foi de 48 horas. Ressalta-se que o material amostrado no nosso estudo, antes da semeadura nas placas, já tinha sido incubado por 48 horas. Já nos estudos de VAN WINKELHOFF; CARLEE; GRAAFF (1985), HAAPASALO et al. (1986) e HAAPASALO (1989) o período de incubação foi de sete dias. Ademais, até oito dias foi o período de incubação, também em jarra de anaerobiose, no estudo de MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1999).

Quanto aos processos identificatórios, no nosso experimento, os mesmos foram baseados no uso de meios de cultivo. Salientamos que em poucas ocasiões uma única prova, ou meio de cultivo leva à identificação definitiva de um organismo. Em geral, há necessidade da conjunção de mais de um meio, com a conseqüente obtenção de várias características metabólicas, que irão fornecer a identidade da bactéria em estudo.

A diversidade dos métodos de detecção de microrganismos é um fator verdadeiramente responsável pelos diferentes resultados descritos na literatura. Os autores GONÇALVES; MOUTON (1999) avaliaram quatro diferentes métodos moleculares de detecção do *Bacteroides forsythus* em canais radiculares infectados. Os autores constataram que a prevalência das espécies variavam em função do método de detecção usado.

Encontramos no nosso experimento o gênero *Peptostreptococcus*, como nos estudos de BERGENHOLTZ (1974), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1981); BYSTRÖN; SUNDQVIST

(1983), MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990), FUKUSHIMA et al. (1990), KONTAKIOTIS; NAKOU; GEORGOPOULOU (1995), SUNDQVIST et al. (1979), LABRIOLA; MASCARO; ALPERT (1983), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983), YOSHIDA et al. (1987), BAUMGARTNER (1991), HASHIOKA et al. (1992), GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b).

Fusobacterium nucleatum também foi encontrado no nosso experimento, assim como nos estudos de SABISTON; GOLD (1974), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1981); VON KONOW; NORD; NORDENRAM (1981), OGUNTEBI et al. (1982), BYSTRÖN; SUNDQVIST (1983), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983), HEIMDAHL et al. (1985), WEIGER et al. (1995) e ASSED et al. (1996).

Peptostreptococcus sp. e *Fusobacterium nucleatum* foram os únicos anaeróbios isolados no presente experimento. Foram encontrados em apenas três dos onze casos estudados. Isso indica que a técnica que empregamos possivelmente não foi sensível à totalidade dos anaeróbios, já que outros estudos revelam a prevalência de anaeróbios nos canais radiculares de dentes com periapicopatias agudas (SABISTON; GRIGSBY; SEGERSTROM (1976), ZAVISTOSKI et al. (1980), BROOK; GRIM; KIELICH (1981), WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983), BROOK; FRAZIER; GHER (1991), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a) e GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b)).

A presença de secreções com odor fétido é um dos vários sinais característicos de infecções causadas por germes anaeróbios, segundo BARTH; MATUZIÁK (1995). No presente estudo, dos cinco casos com presença de odor fétido apenas em um deles foi encontrada a

presença de anaeróbios. Esse dado reforça a consideração da possível baixa sensibilidade da técnica empregada.

Encontramos *Enterococcus faecalis* na nossa amostra. Os *Enterococcus* também foram encontrados nos estudos de MOLANDER; REIT; DAHLÉN (1990), GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996a); GOMES; LILLEY; DRUCKER (1996b) e NODA; INOUE; KOMATSU (1999).

Os *Streptococcus* do grupo viridans constituem microbiota normal de diversos sítios anatômicos, em especial das vias aéreas superiores. Esses microrganismos são identificados como patógenos de periapicopatias agudas segundo a literatura: WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983), HEIMDHAL et al. (1985), LEWIS; MacFARLANE; McGOWAN (1986), FISHER; RUSSEL (1993) e GOMES; DRUCKER; LILLEY (1994). O nosso estudo encontrou uma cultura pura de *Streptococcus* do grupo viridans bem como o estudo de WILLIAMS; McCANN; SCHOENKNECHT (1983) achou um representante desse grupo, o *Streptococcus milleri*, em cultura pura.

Tanto o *Streptococcus* sp. grupo viridans quanto os demais aeróbios isolados (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* sp. coagulase negativo e *Streptococcus agalactiae*) são todos relacionados com endocardite bacteriana de acordo com ANTUNES (1995).

As intenções iniciais do presente estudo previam o esclarecimento das questões relacionadas com a etiologia dos processos agudos, oferecendo maiores subsídios para a instituição de uma terapêutica adequada. Entretanto, após a identificação precisa dessa microbiota encontrada, verificamos a inter-relação e relevância desses patógenos não só com

patologias periapicais agudas, mas também com doenças sistêmicas tipo endocardite bacteriana.

O fato de termos isolado tais microrganismos não fundamenta apenas uma terapêutica medicamentosa local endodôntica, mas também fundamenta uma conduta já preconizada pela Associação Americana de Cardiologistas, qual seja a de usar regularmente medicação antimicrobiana sistêmica preventiva em pacientes de risco para o desenvolvimento de endocardite infecciosa (pacientes portadores de prótese valvar cardíaca, doença valvar aórtica, febre reumática prévia com disfunção valvar, entre outras patologias segundo WANMACHER; FERREIRA (1999)).

O estudo realizado alerta para a importância do conhecimento do paciente como um todo. Isso não diz respeito apenas ao cirurgião-dentista, que deve saber da condição de saúde geral do seu paciente, mas também ao médico, que deve saber sobre a saúde bucal do seu paciente.

7. CONCLUSÕES:

Nesse estudo foi possível identificar algumas bactérias potencialmente patogênicas em periapicopatias agudas, tais como *Peptostreptococcus* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus* sp. grupo viridans e *Enterococcus faecalis*. No entanto, a técnica empregada pode não ter sido adequada para determinar a composição bacteriana específica das periapicopatias agudas, considerando que não houve crescimento bacteriano em quase metade das amostras, que bactérias anaeróbias foram isoladas em apenas três dos 11 casos e que culturas mistas foram identificadas em apenas uma das amostras.

SUMMARY:

A deep knowledge about endodontic microbiology is a fundamental resource to understand the role of bacteria in the origin and development of periapical pathosis as well as to provide database for adequate therapy. Our objective is to investigate the composition of bacterial flora in acute periapical pathosis, and identify the microorganisms found in the root canal of the teeth *in vivo*. We have studied 11 teeth from 11 subjects. The results were negative in five teeth and two microorganisms (*Staphylococcus* sp. and *Peptostreptococcus* sp.) were found in one sample. *Peptostreptococcus* sp., *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae* and viridans streptococcus were found as pure culture in other five teeth. In this study, we were able to identify some potentially pathogenic bacterias in acute periapical pathosis such as *Peptostreptococcus* sp., *Fusobacterium nucleatum*, viridans streptococcus and *Enterococcus faecalis*. Our results indicate that the technique applied might not have been adequate to determine composition of bacterial flora in acute periapical pathosis. Such finding is based on negative bacterial growth in almost half of sample, anaerobic bacterias were isolated just in three out of eleven cases and the mixture involving two bacterias found in only one sample.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. ANTUNES, G. S. **Manual de diagnóstico bacteriológico**. 2.ed. Porto Alegre : da UFRGS, 1995. 278p.
2. ADERHOLD, L. ; KNOTHE, H. ; FRENKEL, G. The bacteriology of dentogenous pyogenic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 52, n. 6, p. 583-587, Dec. 1981.
3. ASSED, S. et al. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 12, n. 2, p. 66-69, Apr. 1996.
4. ATTEBERY, H. R. ; KIMURA, J. T. ; CARROL, G. W. An acute anaerobic infection following endodontic treatment. **J. Endod.**, Baltimore, v. 6, n. 10, p. 793-795, Oct. 1980.
6. BAMMANN, L. ; ESTRELA, C. Aspectos microbiológicos em endodontia. In.: ESTRELA, C. ; FIGUEIREDO, J. A. P. **Endodontia: princípios biológicos e mecânicos**. São Paulo: Artes Médicas, 1999. 819 p. p. 167-189.
7. BARTH, A. ; MATUSIAK, R. Identificação de organismos anaeróbicos. In: ANTUNES, G. S. **Manual de diagnóstico bacteriológico**. Porto Alegre : Ed. da UFRGS, 1995. 278 p. p. 181-199.
8. BAUMGARTNER, J. C. Microbiologia endodôntica. In: WALTON, R. E.; TORABINEJAD, J. **Princípios e prática em endodontia**. São Paulo : Liv. Santos, 1997. 557 p. p. 277-291.

9. _____. Microbiologic and pathologic aspects of endodontics. **Curr. Opin. Dent.**, Philadelphia, v. 1, n. 6, p. 737-743, Dec. 1991.
10. BAUMGARTNER, J. C. et al. Serum IgG reactive with oral anaerobic microorganisms associated with infections of endodontic origin. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 7, n. 2, p. 106-110, Apr. 1992.
11. BERGENHOLTZ, G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. **Odontol. Revy**, Lund, v. 225, n. 4, p.347-358, 1974.
12. BRAUNER, A. W. ; CONRADS, G. Studies into the microbial spectrum of apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 244-248, Sept. 1995.
13. BROOK, I. ; FRAZIER, E. H. ; GHER, M. E. Aerobic and anaerobic microbiology of periapical abscesses. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 6, n. 2, p. 123-125, Apr. 1991.
14. BROOK, I. ; GRIM, S. ; KIELICH, R. B. Bacteriology of acute periapical abscess in children. **J. Endod.**, Baltimore, v. 7, n. 8, p. 378-380, Aug. 1981.
15. BYSTRÖM, A. ; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0,5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 55, n. 3, p. 307-312, Mar. 1983.
16. _____. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 89, n. 4, p. 321-328, Aug. 1981.
17. CARLSSON, J. ; SUNDQVIST, G. Evaluation of methods of transport and cultivation of bacterial specimens from infected dental root canals. **Oral Surg. Oral med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 49, n. 5, p. 451-454, May 1980.

18. CARLSSON, J. ; FRÖLANDER, F. ; SUNDQVIST, G. Oxygen tolerance of anaerobic bacteria isolated from necrotic dental pulps. **Acta Odontol. Scand.**, Oslo, v. 35, n. 3, p. 139-145, 1977.
19. CAUDURO, P. F. ; MEZZARI, A. **Bacteriologia e micologia no laboratório**. Porto Alegre: Merck, 1989. 132 p.
20. DE DEUS, Q. D. de **Endodontia**. 5.ed. Rio de Janeiro : Médica e Científica, 1992. 695p.
21. FABRICIUS, L. et al. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 90, n. 2, p. 134-144, Apr. 1982.
22. FINEGOLD, S. M. ; BARON, E. J. **Diagnostic Microbiology**. 7.ed. Saint. Louis : The C. V. Mosby Company, 1986. 914 p.
23. FISHER, L. E. et al. The isolation and characterization of Milleri group Streptococci from dental periapical abscesses. **J. Dent. Res.**, Alexandria, v. 72, n. 8, p. 1191-1193, Aug. 1993.
24. FUKUSHIMA, H. et al. Localization and identification of root canal bacteria in clinically asymptomatic periapical pathosis. **J. Endod.**, Baltimore, v. 16, n. 11, p. 534-538, Nov. 1990.
25. GOLDBERG, M. H. The changing biologic nature of acute dental infection. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 80, n. 5, p. 1048-1051, May 1970.
26. GOLDIM, J. R. (Org.) **Pesquisa em saúde : leis, normas e diretrizes**. 3.ed. Porto Alegre : HCPA, 1997. 156 p.

27. GOMES, B. P. ; DRUCKER, D. B. ; LILLEY, J. D. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 27, n. 6, p. 291-298, Nov. 1994.
28. _____. Associations of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 29, n. 2, p. 69-75, Mar. 1996.
29. _____. Clinical significance of dental root canal microflora. **J. Dent.**, Kidlington, v. 24, n. 1/2, p. 47-55, Jan./Mar. 1996.
30. GONÇALVES, R. B. ; MOUTON, C. Molecular detection of *Bacteroides forsythus* in infected root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v. 25, n. 5, p. 336-340, May 1999.
31. GOODMAN, A. D. Isolation of anaerobic bacteria from the root canal systems of necrotic teeth by the use of a transport solution. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 43, n. 5, p. 766-770, May 1977.
32. GRIFFEE, M. B. et al. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 50, n. 5, p. 457-461, Nov. 1980.
33. HAAPASALO, M. *Bacteroides* spp. in dental root canal infections. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 5, n. 1, p. 1-10, Feb. 1989.
34. HAAPASALO, M. et al. Black-pigmented *Bacteroides* spp. in human apical periodontitis. **Infect. Immun.**, Washington, v. 53, n. 1, p. 149-153, July 1986.
35. _____. Isolation and characterization of a new variant of black pigmented asaccharolytic *Bacteroides*. **FEMS Microbiol. Lett.**, Netherlands, v. 23, n. 2/3, p. 269-274, July/Aug. 1984.

36. HASHIOKA, K. et al. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. **J. Endod.**, Baltimore, v. 18, n. 11, p. 558-561, Nov. 1992.
37. HEAD, J. ; ROOS, C. On the bacteriology of apical abscesses. **J. Dent. Res.**, Baltimore, v. 1, n. 1, p. 13-21, Mar. 1919.
38. HEIMDAHL, A. et al. Clinical appearance of orofacial infections of odontogenic origin in relation to microbiological findings. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 22, n. 2, p. 299-302, Aug. 1995.
39. KAKEHASHI, S. ; STANLEY, H. R. ; FITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 20, n. 3, p. 340-349, Sept. 1965.
40. KANNANGARA, D. V. ; THADEPALLI, H. ; McQUIRTER, J.L. Bacteriology and treatment of dental infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 50, n. 2, p. 103-109, Aug. 1980.
41. KANTZ, W. E. ; HENRY, C. A. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact pulp chambers of non-vital teeth in man. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 91-96, Jan. 1974.
42. KEUDELL, K. et al. Microorganisms isolated from pulp chambers. **J. Endod.**, Baltimore, v. 2, n. 5, p. 146-148, May 1976.
43. KONTAKIOTIS, E. ; NAKOU, M. ; GEORGOPOULOU, M. In vitro study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 28, n. 6, p. 285-289, Nov. 1995.

44. LABRIOLA, J. D. ; MASCARO, J. ; ALPERT, B. The microbiologic flora of orofacial abscesses. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 41, n. 11, p. 711-714, Nov. 1983.
45. LEWIS, M. A. ; MacFARLANE, T. W. ; McGOWAN, D. A. Quantitative bacteriology of acute dento-alveolar abscesses. **J. Med. Microbiol.**, London, v. 21, n. 2, p. 101-104, Mar. 1986.
46. LUISI, S.B. ; FACHIN, E. V. F. Revisão e enfoque clínico sobre a bacteriologia das infecções endodônticas agudas. **Rev. Fac. Odontol.**, Porto Alegre, 1999. (No prelo)
47. MacDONALD, J. B. ; HARE, G. C. WOOD, A. W. S. The bacteriologic status of the pulp chambers in intact teeth found to be nonvital following trauma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 10, n. 3, p. 318-322, Mar. 1957.
48. MILANO, N. F. ; CAMINHA, J. A. Odontometria. **Rev. Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 19, n. 1, p. 26-35, jan./mar. 1971.
49. MILANO, N. F. ; GRASSI, V. ; BONORINO, X. Odontometria em polirradiculares. **Rev. Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 25, n. 3, p. 144-146, jul./set. 1977.
50. MILANO, N. F. ; SILVA, C. A. G. Comprimento e distorção na condutometria. **Rev. Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 36, n. 2, p. 97-98, mar./abr. 1988.
51. MILLER, W. D. The decomposition of the contents of the dentinal tubules as a disturbing factor in the treatment of the pulpless teeth. **Dent. Cosmos**, Philadelphia, v. 32, n. 5, p. 349-357, Apr. 1890.

52. MOLANDER, A. ; REIT, C. ; DAHLÉN, G. Microbiological evaluation of clindamycin as a root canal dressing in teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 23, n. 2, p. 113-118, Mar. 1990.
53. MÖLLER, A. J. R. et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. **Scand. J. Dent. Res.**, Copenhagen, v. 89, n. 6, p. 475-484, Dec. 1981.
54. MURRAY, P. R. et al. (Ed.) **Manual of clinical Microbiology**. 6.ed. Washington : ASM Press, 1995. 1482 p.
55. NAIR, R. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. **J. Endod.**, Baltimore, v. 13, n. 1, p. 29-39, Jan. 1987.
56. NODA, M. ; INOUE, S. ; KOMATSU, H. A comparison of methods for detecting bacteria in root canal exudate. **J. Endod.**, Baltimore, v. 25, n. 3, p. 187-189, Mar. 1999.
57. OGUNTEBI, B. et al. Predominant microflora associated with human dental periapical abscesses. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 15, n. 5, p. 964-966, May 1982.
58. PANTERA, E. A ; ZAMBON, J. J. ; SHIH-LEVINE, M. Indirect Immunofluorescence for the detection of *Bacteroides* species in human dental pulp. **J. Endod.**, Baltimore, v. 14, n. 5, p. 218-223, May 1988.
59. PETERS, L. B. ; WESSELINK, P. R. ; MOORER, W. R. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 28, n. 2, p. 95-99, Mar. 1995.
60. SABISTON Jr., C. B. ; GOLD, W. A. Anaerobic bacteria in oral infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 28, n. 2, p. 187-192, Aug. 1974.

61. SABISTON Jr., C. B. ; GRIGSBY, W. R. ; SEGERSTROM, M. T. Bacterial study of pyogenic infections of dental origin. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 41, n. 4, p. 430-435, Apr. 1976.
62. SHAH, H. N. ; COLLINS, M. D. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, Washington, v. 38, n. 1, p. 128-131, Jan. 1988.
63. SILVA, V. G. da ; BERCHET, S. M. B. **Manual de biossegurança**. Porto Alegre : UFRGS, Faculdade de Odontologia, 1997. 10 p.
64. SIQUEIRA Jr., J. F. ; De UZEDA, M. ; FONSECA, M. E. F. A scanning electron microscopic dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. **J. Endod.**, Baltimore, v. 22, n. 6, p. 308-310, June 1996.
65. SUNDQVIST, G. Associations between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 7, n. 5, p. 257-262, Oct. 1992.
66. _____. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the canal flora. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 78, n. 4, p. 522-530, Oct. 1994.
67. SUNDQVIST, G. ; JOHANSSON, E. ; SJÖGREN, U. Prevalence of black-pigmented *Bacteroides* species in root canal infections. **J. Endod.**, Baltimore, v. 15, n. 1, p. 13-19, Jan. 1989.
68. SUNDQVIST, G. et al. Capacity of anaerobia bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections. **Infect. Immun.**, Washington, v. 25, n. 2, p. 685-693, Aug. 1979.

69. SYDNEY, W. B. ; ESTRELA, C. Influence of root canal preparation on anaerobic bacteria in teeth with asymptomatic apical periodontitis. **Braz. Endod. J.**, Goiânia, v. 1, n. 1, p. 7-10, 1996.
70. THILO, E.B. ; BAEHNI, P. ; HOLTZ, J. Dark-field observation of the bacterial distribution in root canals following pulp necrosis. **J. Endod.**, Baltimore, v. 12, n. 5, p. 202-205, May 1986.
71. TORTAMANO, N. **Antissépticos e desinfetantes em Odontologia**. São paulo : Liv. Santos, 1991. 39 p.
72. TROPE, M. ; ROSEMBERG, E. ; TRONSTAD, L. Darkfield microscopic spirochete count in the differentiation of endodontic and periodontal abscesses. **J. Endod.**, Baltimore, v. 18, n. 2, p. 82-86, Feb. 1992.
73. TROPE, M. et al. Darkfield microscopy as a diagnostic aid in differentiating exudates from endodontic and periodontal abscesses. **J. Endod.**, Baltimore, v. 14, n. 1, p. 35-38, Jan. 1988.
74. VAN WINKLHOFF, A. J. ; CARLEE, A. W. ; GRAAFF, J. *Bacteroides endodontalis* and other black-pigmented *Bacteroides* species in odontogenic abscesses. **Infect. Immun.**, Washington, v. 49, n. 3, p. 494-497, Sept. 1985.
75. VAN WINKELHOFF, A. J. ; VAN STEENBERGEN, T. J. M. ; GRAFF, J. *Porphyromonas (bacteroides) endodontalis*: its role in endodontal infections. **J. Endod.**, Baltimore, v. 18, n. 9, p. 431-434, Sept. 1992.
76. VON KONOW, L. ; NORD, C. E. ; NORDENRAM, A. Anaerobic bacteria in dentoalveolar infections. **Int. J. Oral Surg.**, Copenhagen, v. 10, n. 5, p. 313-322, 1981.

77. WANMACHER, L. ; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica para dentistas**. 2.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 1999. 349p.
78. WEIGER, R. et al. Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth. **Endod. Dent. Traumatol.**, Copenhagen, v. 11, n. 1, p. 15-19, Feb. 1995.
79. WILLIAMS, B. L. ; McCANN, G. F. ; SCHOENKNECHT, F. D. Bacteriology of dental abscesses of endodontic origin. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 18, n. 4, p. 770-774, Oct. 1983.
80. WINKLER, K. C. ; VAN AMEROGEN, J. Bacteriologic results from 4,000 root canal cultures. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 12, n. 7, p. 857-1123, July 1959.
81. YOSHIDA, M. et al. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. **J. Endod.**, Baltimore, v. 13, n. 1, p.24-28, Jan. 1987.
82. ZAVISTOSKI, J. et al. Quantitative bacteriology of endodontic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, Saint Louis, v. 49, n. 2, p. 171-174, Feb. 1980.

ANEXO 1: Ficha clínica

NOME: _____

SEXO: _____ RAÇA: _____ IDADE: _____

MEDICAÇÃO SISTÊMICA: _____ () SIM _____ () NÃO

QUAL? _____

FICHA CLÍNICA:

DENTE: _____ CONDIÇÃO DA COROA: _____

SENSIBILIDADE À DIGITAÇÃO APICAL: () SIM () NÃO

DOR À PRESSÃO: () SIM () NÃO

DOR À PERCUSSÃO: () SIM () NÃO

EDEMA NA REGIÃO APICAL: () SIM () NÃO

ODOR FÉTIDO: () SIM () NÃO

CLASSIFICAÇÃO DA DOR QUANTO À :

ESTÍMULO: _____

DURAÇÃO: _____

INTENSIDADE: _____

LOCALIZAÇÃO: _____

OBSERVAÇÕES RADIOGRÁFICAS: _____

ANEXO 2: Termo de Consentimento

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO

Embora uma ampla variação de espécies bacterianas tenha sido isolada de canais radiculares infectados, justifica-se determinar se algum grupo particular de bactérias está associada com periapicopatias agudas. Esta proposta visa esclarecer questões relacionadas à etiologia do processo patológico dos abscessos apicais agudos, oferecendo maiores subsídios para a instituição de um tratamento mais adequado.

Essa pesquisa será realizada durante o atendimento de urgência ao qual você será submetido. Não há qualquer alteração no tratamento convencional, apenas, no momento em que o dente for aberto, um cone de papel será introduzido no canal radicular para se colher material para pesquisa em laboratório. Removido o cone, o tratamento segue convencionalmente.

Você tem a liberdade de se recusar a participar ou retirar o seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo do seu tratamento. Os seus dados confidenciais tem a garantia de sigilo, o que assegura a sua privacidade.

Eu, _____ CI n°: _____
residente na _____ estou a
par dos termos do tratamento a que estou sendo submetido na Faculdade de Odontologia. Esses procedimentos fazem parte de um protocolo de pesquisa a cargo da Cirurgiã-Dentista Simone Bonato Luisi, dos quais estou informado e dou pleno consentimento de execução.

Assinatura do Paciente

Porto Alegre, ____ de _____ de 199__

ANEXO 3: Termo de aprovação na Comissão Científica e de Ética da Faculdade

de Odontologia da UFRGS.
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL

Proc. n.º

A ALUNA SIMONE BRUSTEIN PARA ATENDER
AS EXIGÊNCIAS DO RELATOR.
EM 03/05/99.

João M. J. Corcoran
Adriana Aguiar Coelho de Souza
Secretaria
CPG em Odontologia

AO RELATOR:
Estou colocando em anexo 2 o termo de
consentimento que cada paciente participante
da pesquisa irá responder e assinar e item Considerações
éticas (de Em 5/05/99
Material e Método) Simone Brustein

ATENDIDA A SOLICITAÇÃO, EXCALIBURHE-SE AO
PROF. RUI ORRIPANU, RELATOR.
EM 06/05/99.

João M. J. Corcoran
Adriana Aguiar Coelho de Souza
Secretaria
CPG em Odontologia

Mandado as pesquisas no de passar
para o rel. gto de ética
10/5/99

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa
em 31/5/99.
De ordem ao P.P.61000
Em 18/6/99

Roldão
Jurema Alves Roldão
As. Adm. Comissões FAC/ODO

ANEXO 4: Requisição de solicitação de exames

TRABALHO CIENTÍFICO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Orientação: Profa. Dra. Elaine Vianna Freitas Fachin

Co-Orientação: Profa. Adelina Mezzari

Elaboração: Simone Bonato Luisi

Ao Laboratório **WEINMANN**

Dados Cadastrais do Paciente

Nome Completo: _____

Sexo: _____ Data de Nascimento: _____

Telefone: 316-5008 ou 316-5017

Endereço: Rua Ramiro Barcelos ,2492

Porto Alegre, RS CEP: 900030-003

Identidade: _____ Tipo: _____

Solicito:

() Cultura para aeróbios

() Cultura para Anaeróbios

() Exame Direto

Material: _____

Data: _____

Simone Bonato Luisi
Cirurgiã-Dentista

ANEXO 5: Identificação de cocos aeróbios

1. GRAM-POSITIVOS

O primeiro procedimento tomado para a identificação de cocos Gram-positivos foi diferenciar estafilococos de estreptococos. Através da observação microscópica da morfologia celular pelo método de Gram, os estafilococos se apresentam aglomerados enquanto os estreptococos, em cadeias.

1.1. Cocos gram-positivos em aglomerado:

A partir do crescimento obtido em caldo glicosado fez-se a prova da coagulase. Segundo CAUDURO; MEZZARI (1989), misturou-se uma suspensão espessa de estafilococos com 0,25ml de plasma humano, oxalatado a 0,2% em um tubo 0,5ml e incubou-se a 37°C, em atmosfera convencional. Após quatro horas, fez-se a leitura. Se a leitura foi positiva, foi caracterizado como *Staphylococcus aureus*. Se negativa, caracterizou-se como *Staphylococcus* sp. coagulase-negativo.

1.2. Cocos gram-positivos em cadeia:

O tipo de hemólise apresentado pelos estreptococos é muito importante para sua identificação inicial. Os tipos de hemólise em agar sangue são os seguintes:

1.2.1. *Gama*: Ausência de atividade hemolítica.

1.2.2. *Alfa*: Verifica-se uma zona de hemáceas parcialmente lisadas em volta da colônia, com ou sem coloração, e tonalidade esverdeada ou acastanhada.

1.2.3. *Beta*: Há a lise completa das hemácias ao redor da colônia, resultando um halo nítido da hemólise. Os estreptococos beta-hemolíticos são divididos em 12 grupos. São eles:

1.2.3.1. Grupo A: *Streptococcus pyogenes*. A identificação desse microrganismo é baseada em sua sensibilidade à Bacitracina, que inibe a síntese da parede celular e altera a

permeabilidade da membrana citoplasmática desse estreptococo. Para realização desta prova, o crescimento verificado em meio líquido foi semeado em superfície de agar sangue. Sobre o inóculo, foi colocado um disco de papel de filtro impregnado com Bacitracina na concentração de 0,02g a 0,04g. Após a incubação por 24 horas a 37°C, se houve formação de halo de inibição do crescimento em torno do disco, caracterizou-se o *Streptococcus pyogenes*.

1.2.3.2. Grupo B: *Streptococcus agalactiae*. Foi feito o CAMP teste para o diagnóstico presuntivo:

CAMP teste: Os estreptococos do grupo B produzem um fator extra-celular que potencializa o rompimento das hemáceas de carneiro pela beta-lisina estafilocócica. Dois microrganismos foram semeados perpendicularmente em agar sangue de carneiro, mantendo uma distância entre as estrias de 1cm. Após 18 a 24 horas de incubação a 35-37°C foi feita a leitura da reação. A positividade foi evidenciada se houve um alargamento da zona de hemólise, proporcionando uma imagem semelhante a uma ponta de flecha na junção dos dois microrganismos (FIG. 1).

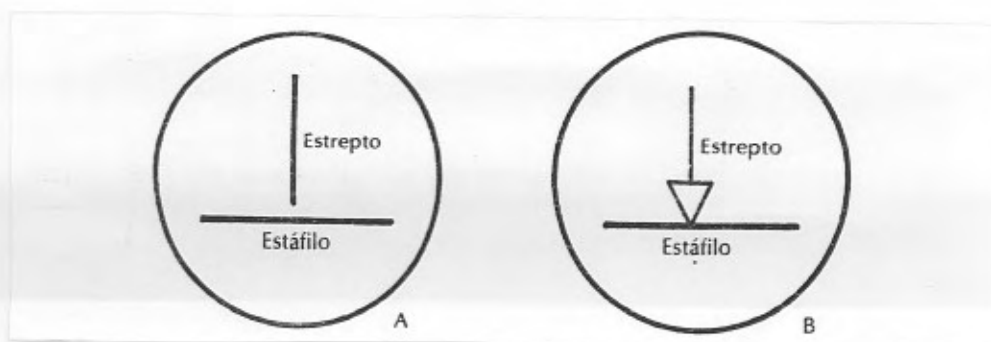


FIGURA 1 - Teste de CAMP

No diagrama B, a zona de intensificação de lise assume a forma de uma cabeça de flecha na intersecção de ambas estrias.

FONTE - CAUDURO; MEZZARI, 1989,p.27

1.2.3.3. Grupo C: *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus zoopidemicus*, *Streptococcus equi*.

1.2.3.4. Grupo D: Este grupo é dividido em dois sub-grupos. O sub-grupo dos Enterococos compreendem as seguintes espécies: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*. O sub-grupo dos não-enterococos compreendem as espécies: *Streptococcus bovis*, *Streptococcus equinus*. Para o diagnóstico presuntivo foram utilizados os seguintes testes:

a) Bile esculina: os estreptococos do grupo D são resistentes à bile (solução a 40%) e hidrolisam a esculina resultando esculetina e glicose. Isso foi observado através da utilização do BEM (agar bile esculina). No passo posterior da reação, a esculetina que se difunde no agar combina com o citrato férrico no meio e forma um complexo enegrecido, quando se obtém um resultado positivo;

b) Tolerância a NaCl 6,5%: os enterococos crescem nesta concentração de NaCl;

c) SF-broth (Difco), caldo púrpura de bromocresol azida (Merck ou similar): os enterococos não são inibidos pela azida sódica e fermentam a dextrose;

d) Resistência ao telurito: usou-se agar sangue com telurito. Se houve crescimento identificou-se um *Enterococcus faecalis*, pois esse apresenta resistência ao telurito.

1.2.3.5. Grupo F: *Streptococcus anginosus*

1.2.3.6. Grupo G: *Streptococcus canis*

1.2.3.7. Grupos E, L, M, P, U e V: nenhum nome é dado às espécies e não são relacionadas com infecções humanas.

De forma ampla, são considerados *Streptococcus* sp. grupo viridans os estreptococos alfa ou gama-hemolíticos que não sejam identificados como pertencentes ao grupo B ou D.

Foi a partir da combinação dos testes presuntivos descritos que obtivemos dados para realizar a identificação dos estreptococos.

2. GRAM-NEGATIVOS

O material foi semeado em agar sangue de carneiro 5% em condições normais (37°C, 24 a 48 horas) e em Thayer-Martin incubado em ambiente CO₂, 37°C. Todas as *Neisserias* são oxidase-positivas. As provas bioquímicas foram realizadas em *Cystine Tryptic Agar Medium* (BBL) com 10% de soro ao qual foram acrescidos os carboidratos (glicose, maltose, e sacarose).

ANEXO 6: Identificação de anaeróbios

LEITURA DOS RESULTADOS:

De acordo com as respostas proporcionadas pelo Gram, foi adotada uma determinada rotina para identificação de microrganismos. Na TABELA 1, encontram-se as rotinas utilizadas para cada uma das respostas obtidas pelo método de Gram.

TABELA 1

Rotina utilizada para identificação dos microrganismos a partir da leitura das respostas proporcionadas pelo método de Gram.

| MORFOLOGIA CELULAR | REPIQUE FOI FEITO PARA |
|--|--|
| Bacilos Gram-negativos | Tipo respiratório Verde-brilhante Bile Tiogel Esculina Tioglicolato |
| Cocos Gram-positivos Bacilos Gram-positivos | Tipo respiratório Nitrato Tiogel Esculina Uréia Agar lecitinase-lactose (placa) Esporos (Wirtz mod.) Tioglicolato |
| Cocos Gram-negativos | Tiogel Tioglicolato |

A) Tipo respiratório: após a regeneração, foi mantida a temperatura de 50°C e se semeou com alça tripla, resfriando a seguir em água gelada. O meio tipo respiratório foi incubado 24 a 48 horas em atmosfera convencional. O crescimento foi observado nos clássicos tipos: anaeróbio, microaerófilo, facultativo e aeróbio (FIG. 1).

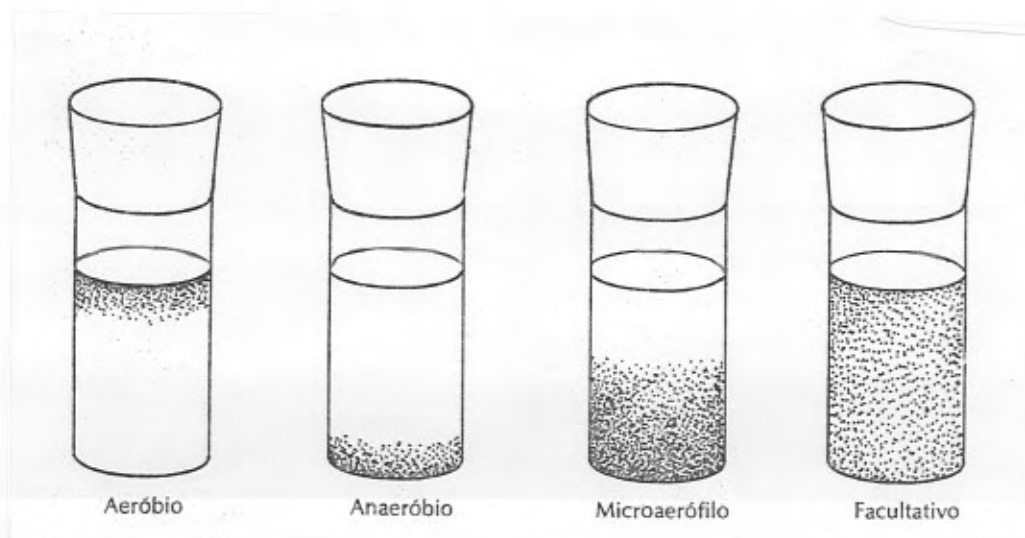


FIGURA 1 - Crescimento no meio tipo respiratório
FONTE - CAUDURO; MEZZARI, 1989. p.66.

B) Produção de gás: devido à natureza semi-sólida e a concentração de glicose no meio tipo respiratório, detectou-se com facilidade a formação de gás, desde algumas bolhas até grande produção.

C) Produção de H_2S : foi usada uma tira de papel de filtro embebida em acetato de chumbo que foi introduzida no tubo de Tiogel.

D) Motilidade: de grande importância para o gênero *Clostridium*. Foi verificada a partir do Tiogel com 24 horas de incubação, entre lâmina e lamínula.

E) Gelatinase: pesquisa-se no Tiogel. Quando houve um bom crescimento, colocou-se o tubo em geladeira, juntamente com uma testemunha (sem inóculo). A leitura foi feita quando o tubo testemunha geleificou. O resultado foi considerado positivo quando o tubo/teste não geleificou.

F) Indol: foi realizada uma pesquisa no tubo de Tiogel com reativo de Kovacs (cinco gotas), sem agitar. O resultado foi considerado positivo, quando houve o aparecimento de um anel vermelho.

G) Verde-brilhante: esta prova serve para separar os gêneros *Bacteroides* (VB-) do *Fusobacterium* (VB+). A solução de verde-brilhante foi adicionada a um tubo de tipo respiratório quando a 50°C. Foi feita a semeadura em ambos os tubos, com e sem verde-brilhante. A leitura foi realizada por comparação de crescimentos: Verde-brilhante (+) quando houve crescimento igual ao controle; Verde-brilhante (-) quando houve ausência de crescimento ou reduzido.

H) Catalase: foi colocado em vidro de relógio um fragmento do crescimento. Durante 30 minutos foi deixado à temperatura ambiente, quando foi acrescentado gotas de H₂O₂ (10 volumes). Observou-se então o surgimento de bolhas.

I) Bile: em meio apropriado foi feita a leitura da presença ou não de crescimento, comparando com um tubo isento de bile.

J) Esculina: a hidrólise da esculina foi revelada com uma solução aquosa de citrato férrico amoniacal a 1%. A positividade foi obtida se ocorreu uma coloração marron-escuro .

K) Nitrato: a redução a nitrito foi revelada pelo reativo de Griess-Ilosva. Foi considerado positivo quando houve o aparecimento da cor vermelha.

L) Leite: alguns anaeróbios têm a facilidade de coagular o leite.

M) Uréia: o meio "Urease Teste Broth" (Merck ou similar) foi utilizado.

Nas FIG. 2, 3 e 4 a seguir, vê-se a ilustração dos resultados do bioquimismo assim como a identificação bacteriana, segundo CAUDURO; MEZZARI (1989).

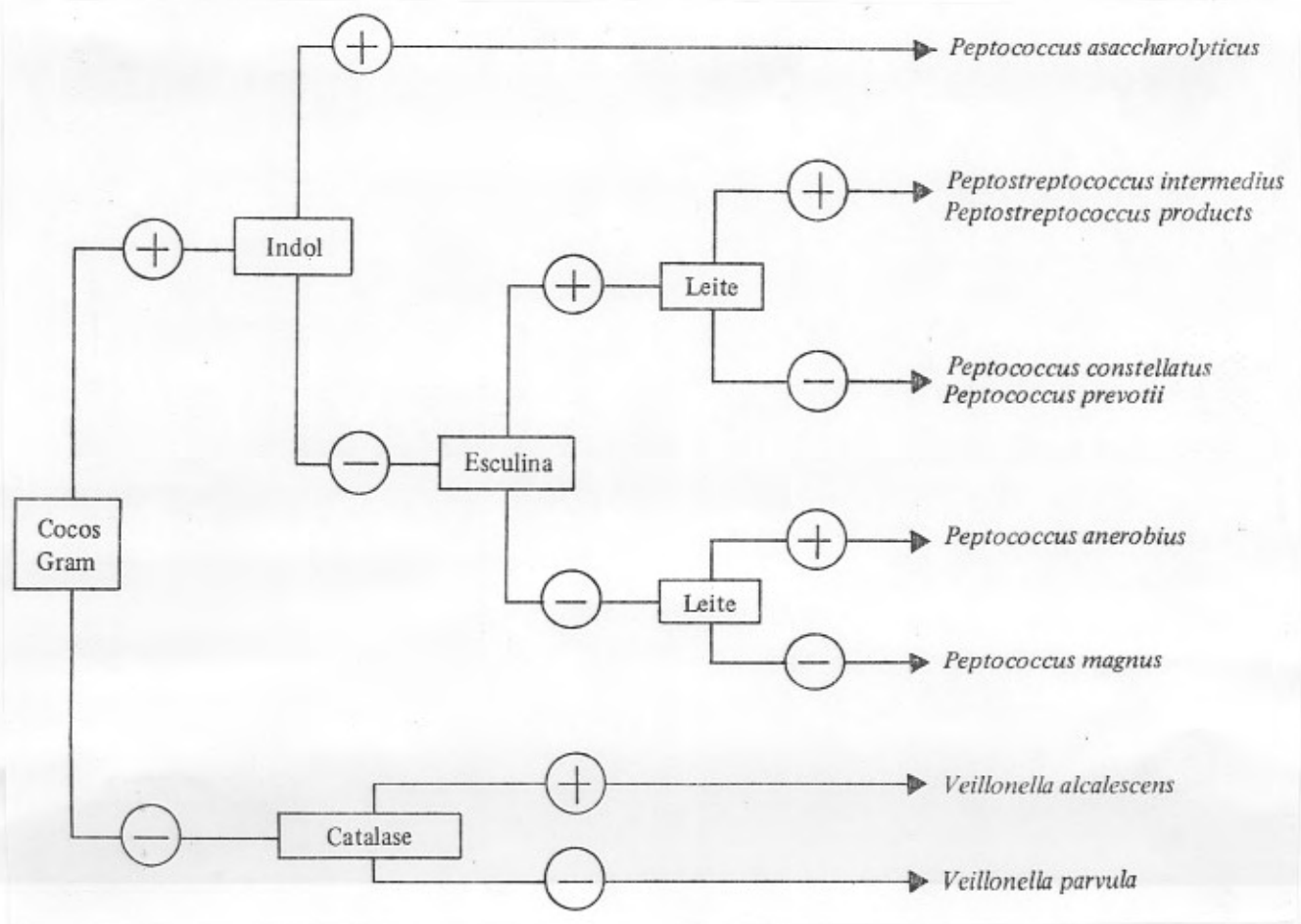


FIGURA 2 - Identificação de cocos
 FONTE: CAUDURO; MEZZARI, 1989. P.69.

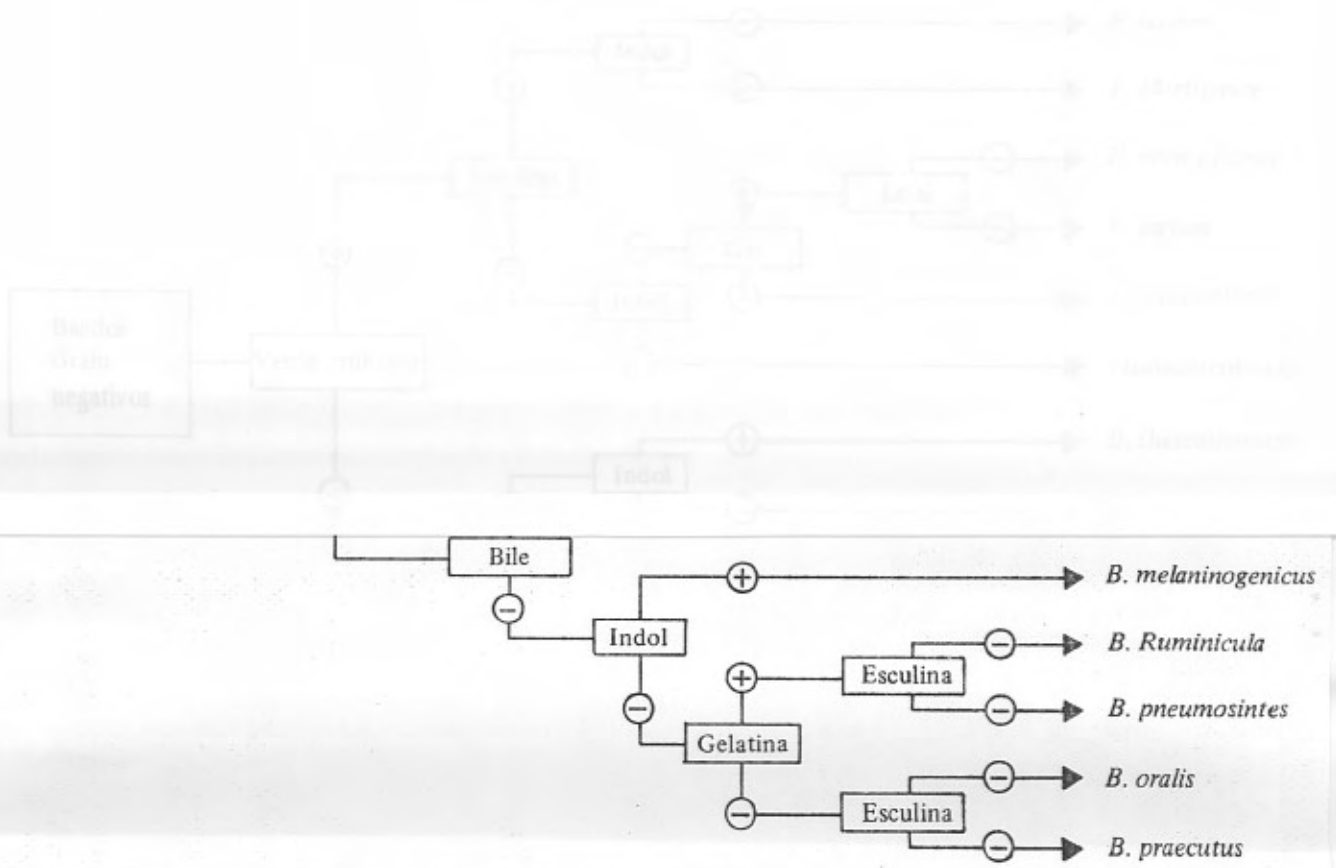


FIGURA 3 - Identificação de bacilos Gram-negativos
 FONTE - CAUDURO; MEZZARI 1989. p.70

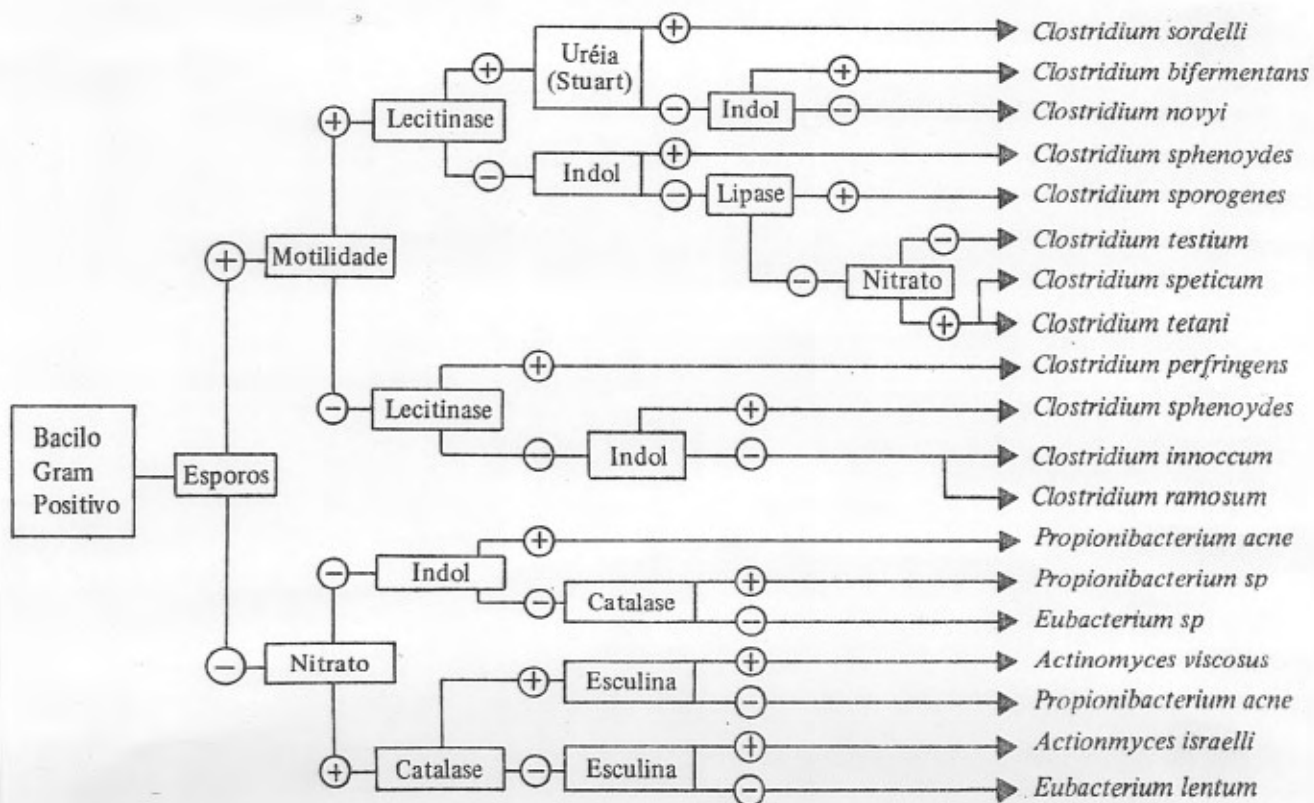


FIGURA 4 - Identificação de bacilos Gram-positivos
 FONTE - CAUDURO; MEZZARI, 1989. p.71.

ANEXO 7: Meios de cultura

1. MEIOS DE CULTURA:

A seguir segue a descrição dos meios de cultura utilizados (CAUDURO; MEZZARI (1989)). As denominações estão em inglês, pois como os produtos são importados, assim se encontram no mercado.

1.1. BBE (Bacteróides Bile Esculina):

| | |
|--------------------------------|--------|
| Trypticase Soy Agar | 4g |
| Oxgall | 2g |
| Aesculin | 0,1g |
| Citrato férrico amoniacal | 0,05g |
| Solução Hemina bovina 5mg/ml | 2ml |
| Solução de gentamicina 40mg/ml | 0,25ml |
| Água destilada | 100ml |
| pH 7,0 | |

Distribuiu-se 15ml em tubos. Foram autoclavados a 121°C, durante 15 minutos.

Plaqueou-se no momento de usar. Microrganismos do gênero *Bacteroides* hidrolisam a esculina à esculetina que forma um complexo escuro revelado pela presença de colônias pretas. O gênero *Bacteroides* é resistente à bile.

1.2. BEM (Agar Bile Esculina):

| | |
|------------------|-----|
| Extrato de carne | 3g |
| Peptona | 5g |
| Agar | 15g |

| | |
|-----------------|--------|
| Bile | 40g |
| Citrato férrico | 0,5g |
| Água destilada | 1000ml |

Foi autoclavado a 121°C, durante 15 minutos. Os *Streptococcus* do Grupo D são resistentes à bile e hidrolisam a esculina à esculetina formando um complexo escuro revelado no meio da cultura.

1.3. Brucella Agar (clássica fórmula por litro de água purificada):

| | |
|-----------------------------------|------|
| Pancreatic Digest of Casein (USP) | 10g |
| Peptic Digest of Animal Tissue | 10g |
| Dextrose | 1g |
| Yeast Extract | 2g |
| Sodium Chloride | 5g |
| Sodium Bisulfite | 0,1g |
| Agar | 15g |

Foram preparadas placas de Brucella agar com 5% de sangue de cavalo desfibrinado, além dos ingredientes listados acima.

1.4. Caldo Glicosado ou Trypticase Soy:

| | |
|----------------------|--------|
| Trypticase Soy Broth | 30g |
| Água destilada | 1000ml |
| pH 7,3 | |

Foi autoclavado a 121°C, durante 15 minutos.

1.5. Cystine Tryptic Agar

| | |
|-----------------|---------|
| Cystine | 0,5g |
| Trypticase | 20g |
| Agar | 2,5g |
| Sodium chloride | 5g |
| Sodium sulfite | 0,5g |
| Phenol red | 0,017g |
| Água destilada | 1000 ml |
| ph 7,3 | |

Para as provas bioquímicas foi adicionado os carboidratos à razão de 0,5 - 1% antes da esterilização.

1.6. Esculina:

| | |
|--|-------|
| Thioglycollate 135 C (BBL) | 3g |
| Água destilada | 100ml |
| Dissolução em banho-maria | |
| Aesculin (Difco) | 1g |
| Solução de vitamina K-Hemina (Larboclin) | 1ml |

Foram distribuídos 4ml em tubos de 9 x 90mm. Foram esterilizados a 115°C, durante 15 minutos. No momento de usar, foi regenerado e acrescentou-se:

| | |
|------------------------------------|-------|
| Solução de bicarbonato de sódio 2% | 0,2ml |
| Soro de cavalo | 0,2ml |
| Revelador da prova da esculina: | |

Citrato férrico amoniacal 1g

Água destilada 100ml

O meio fica preto quando positivo.

1.7. MacConkey Agar:

Peptone 17g

Polypeptone 3g

Lactose 10g

Bile Salts Mixture 1,5g

Sodium Chloride 5g

Agar 13,5g

Neutral Red 0,03g

Crystal violet 0,001g

Água destilada 1000ml

pH 7,1

É um meio seletivo e indicador de bacilos Gram-negativos. Na presença de sais biliares e cristal violeta inibem o crescimento de bactérias Gram-positivas.

Microrganismos que fermentam a lactose (lactose-positiva) provocam a viragem do meio por acidificá-lo com produtos metabólicos. As colônias aparecem em tonalidade rósea ao passo que as lactose-negativas aparecem em tom amarelo. Foi autoclavado a 121°C, durante 15 minutos.

1.8. Nitrato:

| | |
|------------------------------|-------|
| Thioglycollate 135 C (BBL) | 3g |
| Água destilada | 100ml |
| Nitrato de potássio | 0,1g |
| Dissolução em banho-maria | |
| Solução de vitamina K-Hemina | 1ml |

Foram distribuídos 4ml em tubos de 9 x 90mm. Foram esterilizados 115°C, durante 15 minutos. No momento de usar, foi regenerado e acrescentou-se:

| | |
|------------------------------------|-------|
| Solução de bicarbonato de sódio 2% | 0,2ml |
| Soro de cavalo | 0,2ml |

Revelador da prova de Nitrato (Reativo de Griess-Islova):

Solução A:

| | |
|-------------------|-------|
| Ácido sulfanílico | 0,8g |
| Ácido acético | 30ml |
| Água destilada | 100ml |

Solução B:

| | |
|---------------------------|-------|
| N, N-alpha, 1 naftalamina | 0,5g |
| Ácido acético | 30ml |
| Água destilada | 100ml |

1.9. SF-Broth, SF Medium ou Caldo Púrpura de Bromocresol Azida (Merck):

| | |
|------------|-----|
| Trypticase | 10g |
| Dextrose | 5g |

| | |
|-------------------------|--------|
| Dipotassium phosphate | 4g |
| Monopotassium phosphate | 1,5g |
| Sodium azide | 0,5g |
| Sodium Chloride | 5g |
| Brom Cresol Purple | 0,032 |
| Água destilada | 1000ml |
| pH 6,9 | |

Foi autoclavado a 121°C, durante 15 minutos. A utilização da dextrose pelos *Enterococcus faecalis* acidifica o meio, provocando uma viragem de cor para o amarelo. A azida sódica inibe a flora Gram-negativa.

1.10. Tioglicolato (anaeróbios):

| | |
|------------------------------|-------|
| Thioglycollate 135 C (BBL) | 3g |
| Água destilada | 100ml |
| Gelatina | 5g |
| Dissolução em banho-maria | |
| Solução de vitamina K-Hemina | 1ml |

Foram distribuídos 4ml em tubo 9 x 90mm para repiques das colônias em cultura primária. Foram esterilizados 115°C, 15 minutos. No momento de usar, foi regenerado e acrescentou-se:

| | |
|------------------------------------|----------------------|
| Solução de bicarbonato de sódio 2% | 0,2ml (tubos de 4ml) |
| Soro de cavalo | 0,2ml (tubos de 4ml) |

1.11. Tiogel:

| | |
|------------------------------|-------|
| Thioglycollate 135 C (BBL) | 3g |
| Água destilada | 100ml |
| Gelatina | 5g |
| Dissolução em banho-maria | |
| Solução de vitamina K-Hemina | 1ml |

Foram distribuídos 4ml em tubo 9 x 90mm. Foram esterilizados 115°C, 15 minutos.

No momento de usar, foi regenerado e acrescentou-se:

| | |
|------------------------------------|-------|
| Solução de bicarbonato de sódio 2% | 0,2ml |
| Soro de cavalo | 0,2ml |

1.12. Tipo respiratório (TR):

| | |
|------------------------------|-------|
| Thioglycollate 135 C (BBL) | 3g |
| Água destilada | 100ml |
| Agar | 250mg |
| Dextrose | 400mg |
| Dissolver em banho-maria | |
| Solução de vitamina K-Hemina | 0,1ml |

Foram distribuídos 4ml em tubo 9 x 90mm. Foram esterilizados a 115°C, 15 minutos. No momento de usar, foi regenerado e acrescentou-se:

| | |
|------------------------------------|-------|
| Solução de bicarbonato de sódio 2% | 0,2ml |
| Soro de cavalo | 0,2ml |

1.13. Trypticase Soy Agar, Agar Casoy, Agar Soja Tripcaseína ou agar sangue:

| | |
|-----------------|--------|
| Trypticase | 15g |
| Phytone | 5g |
| Sodium Chloride | 5g |
| Agar | 15g |
| Água destilada | 1000ml |
| pH 7,3 | |

Foi autoclavado a 121°C, durante 15 minutos.

É o meio utilizado com maior frequência na rotina bacteriológica, na semeadura primária com ou sem adição de 5% de sangue desfibrinado. Suporta o crescimento de numerosos microrganismos desde os menos até os mais exigentes (fastidiosos), dado o valor nutritivo das duas peptonas presentes e do sangue. Sendo que não é um meio seletivo, fornece a hemólise dos microrganismos, principalmente no caso dos *Streptococcus* que auxiliam na sua classificação.

1.14. Urease Test Broth:

| | |
|-------------------------|--------|
| Uréia | 20g |
| Monopotassium phosphate | 9,1g |
| Disodium phosphate | 9,5g |
| Yeast extract | 0,1g |
| Phenol red | 0,01g |
| Água destilada | 1000ml |
| pH 6,8 | |

Foram esterilizados por filtração ou autoclavação. Bactérias produtoras de urease hidrolisam a uréia mudando de cor o meio de amarelo para vermelho pela viragem do indicador vermelho de fenol.

1.15. Verde-brilhante:

Solução:

| | |
|-------------------------|-------|
| Verde-brilhante (Merck) | 32g |
| Água destilada | 100ml |

Foi esterilizado a 115°C, durante 15 minutos e se estocou na geladeira.

Uso: tipo respiratório (4 ml em tubo 9 x 90mm). No momento de usar, foi regenerado e acrescentou-se antes do resfriamento rápido:

| | |
|------------------------------------|-------|
| Solução de bicarbonato de sódio 2% | 0,2ml |
| Soro de cavalo | 0,2ml |
| Solução verde-brilhante | 0,2ml |

Inoculou-se com alça tripla e em seguida resfriou-se bruscamente.

ANEXO 8: Resultados dos exames microbiológicos.

Paciente nº 1:



LABORATÓRIO
WEINMANN



MV 599.241

11/06/99


Entrega MV

Bacteriológico

material : abscesso apical agudo
resultado: ausência de crescimento bacteriano

Cultura - anaeróbios

material: abscesso apical agudo
resultado: Negativo

Dra. Adelina Mezzari 
Conferência por vídeo

Paciente nº 2 (bacteriológico):



LABORATÓRIO
WEINMANN



MV 599.245

11/06/99

Entrega MV

Bacteriológico

material : canal radicular necrótico

(1) *Staphylococcus sp* (coagulase negativo)

| | (1) | (2) | (3) | | (1) | (2) | (3) |
|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----|
| Ampicilina | - | | | Ceftazidima | - | | |
| Cefalotina | - | | | Aztreonan | - | | |
| Amox+ac. clavul. | - | | | Imipenem | - | | |
| Cefoxitina | - | | | Ciprofloxacina | - | | |
| Ceftriaxone | - | | | Tobramicina | - | | |
| Trimeto+sulfa | S | | | Carbenicilina | - | | |
| Amicacina | - | | | Norfloxacina | - | | |
| Gentamicina | - | | | Nitrofurantoina | - | | |
| Penicilina | R | | | Amp./Sulbac | S | | |
| Oxacilina | S | | | - | - | | |
| Tetraciclina | - | | | - | - | | |
| Eritromicina | R | | | - | - | | |
| Clindamicina | S | | | - | - | | |
| Vancomicina | S | | | | | | |

R = resistente

I = intermediário

M = moderadamente sensível

S = sensível

Dra. Adelina Mezzari 

Conferência por vídeo

Paciente nº 2 (cultura - anaeróbios):



LABORATÓRIO
WEINMANN



MV 599.245

11/06/99

Entrega MV

Cultura - anaeróbios

material: canal radicular necrótico


resultado: *Peptostreptococcus* sp. (MIC padrão)

Penicilina 0,5 mcg/ml

Clindamicina 1,5 mcg/ml

Metronidazol 1,5 mcg/ml

Carbenicilina 2,0 mcg/ml

Dra. Adelina Mezzari 

Conferência por vídeo

Paciente nº 3:



LABORATÓRIO
WEINMANN



CLARA ROSSETI MACHADO BALBIN

MV 599.246

11/06/99

Entrega MV

Bacteriológico

material : canal radicular necrótico

resultado: ausência de crescimento bacteriano

Cultura - anaeróbios

material: canal radicular necrótico


resultado: *Peptostreptococcus* sp. (MIC padrão)

Penicilina 0,5 mcg/ml

Clindamicina 1,5 mcg/ml

Metronidazol 1,5 mcg/ml

Carbenicilina 2,0 mcg/ml

Dra. Adelina Mezzari 

Conferência por vídeo

Paciente nº 4:



LABORATÓRIO
WEINMANN



MV 599.248

11/06/99

Entrega MV

Bacteriológico

material : canal radicular necrótico

(1) *Enterococcus faecalis*

| | (1) | (2) | (3) | | (1) | (2) | (3) |
|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----|
| Ampicilina | - | | | Ceftazidima | - | | |
| Cefalotina | - | | | Aztreonan | - | | |
| Amox+ac. clavul. | - | | | Imipenem | - | | |
| Cefoxitina | - | | | Ciprofloxacina | - | | |
| Ceftriaxone | - | | | Tobramicina | - | | |
| Trimeto+sulfa | - | | | Carbenicilina | - | | |
| Amicacina | - | | | Norfloxacina | - | | |
| Gentamicina | - | | | Nitrofurantoina | - | | |
| Penicilina | S | | | | | | |
| Oxacilina | - | | | | | | |
| Tetraciclina | - | | | | | | |
| Eritromicina | - | | | | | | |
| Clindamicina | - | | | | | | |
| Vancomicina | S | | | | | | |

R = resistente

I = intermediário


M = moderadamente sensível

S = sensível

Cultura - anaeróbios

material: canal radicular necrótico

resultado: Negativo

Dra. Adelina Mezzari 

Conferência por vídeo

Paciente nº 5:



LABORATÓRIO
WEINMANN



MV 599.252

11/06/99


Entrega MV

Bacteriológico

material : canal radicular necrótico
resultado: ausência de crescimento bacteriano

Cultura - anaeróbios

material: canal radicular necrótico
resultado: Negativo

Dra. Adelina Mezzari 
Conferência por vídeo

Paciente nº 6:



LABORATÓRIO
WEINMANN



MV 599.239

11/06/99

Entrega MV

Bacteriológico

material : canal radicular necrótico

resultado: ausência de crescimento bacteriano

Cultura - anaeróbios

material: canal radicular necrótico


resultado: *Fusobacterium nucleatum* (MIC padrão)

Clindamicina <0,5 mcg/ml

Metronidazol <0,5 mcg/ml

Cloranfenicol 1,0 mcg/ml

Penicilina 2,0 mcg/ml

Dra. Adelina Mezzari 

Conferência por vídeo

Paciente nº 7:



LABORATÓRIO
WEINMANN



MV 599.237

11/06/99

Entrega MV

Bacteriológico

material : canal radicular necrótico

(1) *Streptococcus agalactiae* (grupo B)

| | (1) | (2) | (3) | | (1) | (2) | (3) |
|------------------|-----|-----|-----|-----------------|-----|-----|-----|
| Ampicilina | - | | | Ceftazidima | - | | |
| Cefalotina | - | | | Aztreonam | - | | |
| Amox+ac. clavul. | - | | | Imipenem | - | | |
| Cefoxitina | - | | | Ciprofloxacina | - | | |
| Ceftriaxone | - | | | Tobramicina | - | | |
| Trimeto+sulfa | - | | | Carbenicilina | - | | |
| Amicacina | - | | | Norfloxacina | - | | |
| Gentamicina | - | | | Nitrofurantoina | - | | |
| Penicilina | S | | | Cloranfenicol | S | | |
| Oxacilina | - | | | - | - | | |
| Tetraciclina | - | | | - | - | | |
| Eritromicina | R | | | - | - | | |
| Clindamicina | S | | | - | - | | |
| Vancomicina | S | | | | | | |

R = resistente

I = intermediário


M = moderadamente sensível

S = sensível

Cultura - anaeróbios

material: canal radicular necrótico

resultado: Negativo

Dra. Adelina Mezzari 

Conferência por vídeo

CENTRAL DE INFORMAÇÕES: FONE (051) 314.3838
MOINHOS DE VENTO: RUA RAMIRO BARCELOS, 910 - 3º ANDAR - CENTRO: RUA GENERAL VITORINO, 77 - 10º ANDAR - PORTO ALEGRE
RESPONSÁVEL TÉCNICO: DR. RUBENS HEMB - CREMERS 6646

11/06/99

Entrega MV