

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PAULINE MASTELLA LANG

PERFIL DE RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
ANAERÓBIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS AGUDAS

Porto Alegre
2017

PAULINE MASTELLA LANG

PERFIL DE RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
ANAERÓBIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS AGUDAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica/Endodontia.

Linha de pesquisa: Epidemiologia, Etiopatogenia e Repercussão das Doenças da Cavidade Bucal e Estruturas Anexas.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Montagner
Coorientadora: Profa Dra Maria Beatriz Cardoso Ferreira

Porto Alegre
2017

CIP - Catalogação na Publicação

Lang, Pauline Mastella

Perfil de resistência a agentes antimicrobianos de bactérias anaeróbias isoladas de infecções endodônticas agudas / Pauline Mastella Lang. -- 2017. 166 f.

Orientador: Francisco Montagner.

Coorientadora: Maria Beatriz Cardoso Ferreira.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Abscesso periapical. 2. Bactérias anaeróbias. 3. Resistência a antibióticos. 4. Fatores de virulência. I. Montagner, Francisco, orient. II. Ferreira, Maria Beatriz Cardoso, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

PAULINE MASTELLA LANG

PERFIL DE RESISTÊNCIA A AGENTES ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
ANAERÓBIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES ENDODÔNTICAS AGUDAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Clínica Odontológica/Endodontia.

Aprovada em 15 set. 2017.

Prof. Dr. Francisco Montagner – Orientador

Profa. Dra. Maria Beatriz Cardoso Ferreira - Coorientadora

Profa. Dra. Ericka Tavares Pinheiro (USP)

Profa. Dra. Rosmari Hörner (UFSM)

Profa. Dra. Fabiana Soares Grecca (UFRGS)

Dedico essa tese a Profa. Dra. Maria Beatriz Cardoso Ferreira
que esteve ao meu lado durante essa etapa como
coorientadora. Profa. Bea, você é um exemplo a ser seguido e
escreveu uma linda história como professora da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
Que o seu legado permaneça entre os que
tiveram a feliz oportunidade de conviver
e aprender com você.

AGRADECIMENTOS

A Deus

“Que na luta não me deixa só, na tristeza é meu consolo e na dificuldade faz maravilhas na minha vida.”

Autor desconhecido

A minha mãe **Celina**

“Que oferece o seu amor sem pedir nada em troca;
Que daria a sua vida para me ter mais uma vez;
Que me estende a mão para me levantar;
Que está presente em todos os momentos mais importantes da minha vida.”

Autor desconhecido

Mãe, obrigada por me escutar, pelas broncas necessárias e algumas nem tanto, por me incentivar quando estava prestes a desistir. Você é meu exemplo.

As minhas irmãs **Caroline** e **Karine**

“Obrigada por me fazerem sonhar, sentir melhor, crescer, rir, acreditar, querer mudar, ir em frente, compartilhar.”

Autor desconhecido

Mana (Caroline), obrigada por ser essa grande amiga, por me receber em Porto Alegre e se fazer presente em todos os momentos.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Francisco Montagner**

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

Chefe, obrigada por acreditar em mim, pela amizade, pelos conselhos e pelo incentivo. A caminhada foi longa, obstáculos apareceram por inúmeras vezes, mas se consegui chegar até aqui é porque tive um orientador que sempre esteve comigo.

A minha coorientadora **Profa. Dra. Maria Beatriz Cardoso Ferreira**

“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão.”

Chico Xavier

Bea, obrigada por estar ao meu lado durante essa etapa, por transmitir o seu conhecimento, por ser essa pessoa maravilhosa e pela consultoria sobre os mais variados assuntos.

As minhas amigas e colegas de doutorado **Ivana M. Zaccara e Letícia B. Mestieri**

“A amizade duplica as alegrias e divide a tristeza.”

Francis Bacon

Gurias, obrigada pelas risadas, pelos cafés, pelas baladas, pelos conselhos nos momentos de indecisão. Com certeza vocês tornaram esse período mais leve.

A minha dupla de doutorado e amiga **Ludmila Coutinho Moraes**

“Bons amigos são como estrelas: nem sempre podemos ver, mas temos certeza que estão sempre lá”

Autor Desconhecido

Lud, obrigada pelos happy hours, pelas caronas, pelas conversas entre os PCRs rodados e pelos milhares de “vamos relaxar” nas horas de angústias.

A minha amiga **Luisa Mercado**

“Melhor amiga não se mede pela presença, mas pelas atitudes que surgem do coração”

Autor Desconhecido

Lu, obrigada pelos conselhos, pelas palavras muitas vezes necessárias, por se fazer presente em todos os momentos, por ser minha irmã de coração.

A minha irmã de coração, colega de graduação e doutorado **Joanna T. Pereira**

“É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações

E assim ter amigos contigo em todas as situações”

Ana Vilela

Jojo, obrigada por me receber em Porto Alegre e na UFRGS, pelo convívio, pela amizade e pelo carinho.

Ao meu casal preferido **Pâmela G. Diesel e Felipe W. Flores**

Pami e Fe, obrigada pelo carinho, pela amizade e pelo apoio ao longo dessa caminhada. Muitas pessoas passam pela nossa vida, mas somente as essenciais permanecem.

A minha amiga **Camilla Tibúrcio Machado**

Cá, sem palavras para agradecer a amizade, o convívio e o incentivo ao longo do doutorado.

A minhas amigas **Júlia Iglesias e Paula Barcellos de Silva**

Ju (mana caçula) e Paula (dupla de urgências), obrigada pelo incentivo, pelas longas conversas e pelos ótimos conselhos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Endodontia de UFRGS (LabENDO), **Ivana M. Zaccara, Letícia B. Mestieri, Ludmila Coutinho Moraes, Júlia Iglesias, Paula Barcellos da Silva, Carolina Bender Hoppe, Karen Barea de Paula, Débora Delai da Costa, Ramiro Quintana, Alexander P. Jardine, Pedro Duarte, Lucas Pinheiro, Otávio Sposito, Manuela F. Santini, Ricardo Abreu da Rosa, Ângela Longo, Gabriela Ferraz Blattes, Flávia Baldasso, Daiana Boijink, Daiana Bottcher, Israel Carlotto, Felipe Barros Matoso, Naelka Sarmento, Luciana Luz, Camila Grock, Natália Leonardo, Bruna Signor.**

Obrigada pela amizade e coleguismo nesse período.

Aos professores da disciplina de Endodontia da UFRGS, **Prof. Dr. Regis Burmeister dos Santos, Prof. Dr. João Ferline, Profa. Dra. Patrícia Kopper, Profa. Dra. Fabiana Soares Grecca, Profa. Dra. Roberta Kochenborger Scarparo, Prof. Dr. Marcus Vínicus Reis Só, Profa. Dra. Renata Grazziotin, Prof. Dr. Tiago André Fontoura de Mello, Prof. Dr. Ricardo Abreu da Rosa, Profa. Dra. Simone Bonato Luisi.**

Obrigada pelo convívio, pela amizade e pelos ensinamentos.

À estagiária do curso de especialização em Endodontia da Faculdade de Odontologia da UFRGS **Alessandra Mendes.**

Ale, obrigada pelas conversas na hora do café e por sempre estar disposta a ajudar.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia da UFRGS (LABIM), **Luisa Mercado, Ariel Rup, Gustavo Eidt, Nailê Damé-Teixeira, Maurício Moura, Maurício Moreira, Andréa Catelan Cardoso, Andrea Recchi, Natacha Amin, Laís Ev, Rafael Schultz Azambuja, Cristina Izquierdo.**

Obrigada pela amizade, pelos almoços, pelas festas e pelas conversas.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de UFRGS (LABIM), **Profa. Dra. Marisa Maltz, Prof. Dr. Rodrigo Arthur, Profa. Dra. Clarrissa Faturri-Parolo, Profa. Dra. Júliana Jobim, Profa. Dra. Lina Naomi Hashizume, Profa. Dra. Sandra Liana Henz, Profa. Dra. Berenice Barbachan e Silva.**

Obrigada pelo convívio e pelo conhecimento transmitido.

Aos alunos de iniciação científica **Daniel Marconi** e **Gabriela Crespo**.

Obrigada pelo convívio, pela ajuda e também pela paciência.

À **Profa. Dra. Tatiane da Silva Dal Pizzol**

Tati, obrigada pelas conversas e pelo ensinamento.

Ao **Cirurgião-Dentista Jorge Viegas**

Obrigada por me receber na Unidade de Pronto Atendimento Moacyr Scliar (Grupo Hospitalar Conceição) e pelo convívio durante as coletas.

À equipe do laboratório de microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), **Prof. Dr. Cícero Dias**, as alunas **Lisiane Rocha** e **Gabriela Rosa da Cunha** e a técnica **Rebeca Inhoque**.

Obrigada pelo ensinamento e pelo carinho durante a realização de parte da tese no laboratório de microbiologia da UFCSPA.

Aos meus colegas e professores do CEOM **Prof. Dr. Mateus Silveira Martins Hartmann, Prof. Dr. José Roberto Vanni, Prof. Dr. Volmir João Fornari, Profa. Flávia Baldissera Marcon, Profa. Caroline Solda, Profa. Marina Lângaro.**

Obrigada pela amizade e pela oportunidade de ter a minha primeira experiência como docente ao lado de grandes mestres.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Obrigada por fornecer suporte financeiro durante o período de doutorado.

“Enquanto você sonha, você está fazendo
um rascunho do seu futuro.”

Charles Chaplin

RESUMO

A presente tese teve como objetivos analisar o padrão de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de infecções endodônticas agudas por meio de uma revisão sistemática e meta-análise (capítulo 1); identificar e determinar a diversidade genotípica, a sensibilidade bacteriana e os fatores de virulência de anaeróbios facultativos isolados em casos de abscesso apical agudo (capítulo 2); e realizar, por meio de uma proposta de informativo, a difusão de informações geradas com orientações sobre o uso de agentes antibióticos em infecções endodônticas agudas para dentistas e pacientes (capítulo 3). A revisão sistemática foi realizada por meio de pesquisa em base de dados na internet e na literatura cinza até maio de 2015. As normas do PRISMA foram seguidas. Estudos clínicos em humanos que avaliaram o perfil de resistência a antimicrobianos de isolados de infecções endodônticas agudas primárias por meio de métodos laboratoriais foram incluídos. O efeito randômico da Meta-análise foi empregado, e o desfecho foi descrito reunindo as taxas de resistência para cada antibiótico testado. Os dados de sete estudos foram extraídos. A taxa de resistência para 15 diferentes agentes antibióticos foram avaliadas, variando entre 3,5% a 40%. Baixas taxas de resistência foram observadas para amoxicilina + clavulanato e amoxicilina, e altas taxas foram observadas para tetraciclina. No capítulo 2, amostras de canais radiculares foram coletadas de sete dentes com diagnóstico de abscesso apical agudo. Bactérias anaeróbias facultativas foram identificadas com o auxílio de métodos fenotípicos e MALDI-TOF MS. A sensibilidade antimicrobiana das cepas isoladas foi determinada para benzilpenicilina, eritromicina e clindamicina por meio da difusão em disco. Bactérias anaeróbias facultativas foram isoladas de 3 dentes. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Actinomyces viscosus* foram identificados. *Streptococcus* spp. e *S. aureus* foram sensíveis à benzilpenicilina. *E. faecalis* (24 cepas) isolados de um mesmo paciente tiveram a sensibilidade antimicrobiana determinada por meio da concentração inibitória mínima para benzilpenicilina, amoxicilina e amoxicilina + clavulanato utilizando-se o E-test. A diversidade genotípica e a presença de fatores de virulência (*ace*, *asa*, *gelE*, *efaA*, *cylA*, *esp*) nas cepas de *E. faecalis* foi analisada por meio do PFGE e PCR, respectivamente. A expressão da gelatinase e da hemolisina foi testada, e a produção de biofilme quantificada. *E. faecalis* foram sensíveis aos antibióticos beta-lactâmicos. O mesmo perfil cromossomal de DNA foi revelado para cepas de *E. faecalis* isoladas. Os genes *gelE*, *ace* e *efaA* foram detectados em 18 cepas. A expressão da gelatinase e a produção de biofilme foram observadas. Cepas de *E. faecalis* tiveram o mesmo perfil de DNA cromossomal, porém parecem apresentar diferentes perfis de virulência. No capítulo 3 foram apresentadas duas propostas de textos informativos. A primeira com o objetivo de orientar o dentista sobre o uso correto dos antibióticos sistêmicos em endodontia. A segunda visa informar os pacientes sobre a utilização dos antibióticos e esclarecer possíveis dúvidas.

Palavras-chaves: Abscesso periapical. Bactérias anaeróbias. Resistência a antibióticos. Fatores de virulência.

ABSTRACT

The present thesis aimed to analyze the antimicrobial resistance profile of bacteria isolated from acute endodontic infections through a systematic review and meta-analysis (Chapter 1); to identify and determine the genotypic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence factors of isolated facultative anaerobes in isolates from acute apical abscess (Chapter 2); and to provide information for dentist and patients generated from guidelines on the use of antibiotic agents in acute endodontic infections (Chapter 3). The electronic databases and the gray literature were searched up to May 2015 for systematic review. PRISMA guidelines were followed. The clinical studies in of humans that have evaluated the antimicrobial resistance of the isolates of primary acute endodontic infections through laboratorial methods were included. A random effect meta-analysis was employed, and the outcome was described as being the pooled resistance rates for each antimicrobial agent. The data from 7 studies were extracted. The resistance rates for 15 different antimicrobial agents were evaluated, ranging from 3.5% to 40.0%. Lower resistance rates were observed for amoxicillin+clavulanate and amoxicillin, and higher resistant rates were detected for tetracycline. In Chapter 2, root canal samples were collected from seven teeth. Facultative anaerobic bacteria were identified by phenotypic methods and MALDI-TOF MS. Antimicrobial susceptibility of strains was determined to benzylpenicillin, erythromycin and clindamycin by disk-diffusion. Facultative anaerobic bacteria were isolated from 3 teeth. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Actinomyces viscosus* were found. *Streptococcus* spp. and *S. aureus* were susceptible to benzylpenicillin. *E. faecalis* strains (n=24) isolated from the same patients had their susceptibility determined by minimum inhibitory concentration of benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin + clavulanate using the E-test. The genotypic diversity and virulence factors (*ace*, *asa*, *gelE*, *efaA*, *cylA*, *esp*) were analyzed in *E. faecalis* strains by PFGE and PCR, respectively. Phenotypic expression of gelatinase and cytolysin were tested. Biofilm production was quantified. All the *E. faecalis* strains were susceptible to β -lactam antibiotics. The same chromosomal DNA fragmentation profile was revealed to *E. faecalis* strains isolated. The *gelE*, *ace* and *efaA* genes were detected in 18 *E. faecalis* strains. Gelatinase expression and biofilm production were observed. *E. faecalis* strains had the same chromosomal DNA profile, but showed virulence profiles different. In Chapter 3, two suggestion for information texts were presented. The first aims to guide dentists on the proper use of systemic antibiotics in endodontics. The second aims to inform patients about the use of antibiotics and clarify possible doubts.

Keywords: Periapical abscess. Anaerobes bacteria. Antimicrobial susceptibility. Virulence factors.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	desoxirribonucleicos fosfatados
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	e colaboradores
g	gramas
h	horas
H ₂ O	água
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
M	molar
mg	miligramas
MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minutos
ml ou mL	mililitros
mmol	milimol
mM	milimolar
mmHg	milímetro de mercúrio
nm	nanômetros
pb ou bp	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
s	segundos
ssp.	espécies
U	unidade
V/cm	volt/centímetro
α	alfa
β	beta
γ	gama
X	número de vezes
%	por cento

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS (CONTINUAÇÃO)

°C	graus Celsius
μM	micromolar
μmol	micromole
μl ou μL	microlitros
μg	microgramas
-	menos
+/-	mais ou menos
<	menor
>	maior
#	diâmetro

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
CAPÍTULO 1 - RESISTENCE POFILES TO ANTIMICROBIAL AGENTS IN BACTERIA ISOLATED FROM ACUTE ENDODONTIC INFECTIONS: SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS	28
CAPÍTULO 2 - SELECTED FACULTATIVE ANAEROBES SPECIES IN ACUTE ENDODONTIC INFECTIONS – PREVALENCE, GENOTIPIC DIVERSITY, ANTIMICROBIAL SENSIBILITY, AND VIRULENCE FACTORS .	57
CAPÍTULO 3 - ORIENTAÇÕES DE USO DE AGENTES ANTIMICROBIANOS EM INFECÇÕES AGUDAS – PROPOSTA DE DIFUSÃO DE CONHECIMENTOS PARA QUALIFICAR A ASSISTÊNCIA EM SAÚDE BUCAL	83
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA	102
APÊNDICE B – SOLUÇÕES PARA ASSEPSIA DO CAMPO OPERATÓRIO .	107
APÊNDICE C – MEIO DE TRANSPORTE	108
APÊNDICE D – MEIOS DE CULTURA	110
APÊNDICE E – CULTIVO E ISOLAMENTO DAS CEPAS.....	114
APÊNDICE F – COLORAÇÃO DE GRAM	115
APÊNDICE G – TESTE DE CATALASE	117
APÊNDICE H – TESTE DA COAGULASE	118

SUMÁRIO (CONTINUAÇÃO)

APÊNDICE I – IONIZAÇÃO POR DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZAÇÃO TIME-OF-FLIGHT - MALDI-TOF) ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MASS SPECTROMETRY – MS)	119
APÊNDICE J – SENSIBILIDADE BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS	120
APÊNDICE K – ELETROFORESE POR GEL PULSÁTIL (PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS - PFGE)	122
APÊNDICE L – PURIFICAÇÃO DE DNA	132
APÊNDICE M – DETECÇÃO DO GENE 16S POR PCR	135
APÊNDICE N – DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA POR PCR	137
APÊNDICE O – TESTE DA HIDRÓLISE DA GELATINASE (EXPRESSÃO DO GENE <i>gelE</i>)	142
APÊNDICE P – TESTE DA HEMÓLISE (EXPRESSÃO DO GENE <i>cyIA</i>)	143
APÊNDICE Q – PRODUÇÃO DE BIOFILME (EXPRESSÃO DO GENE <i>efaA</i>)	144
APÊNDICE S – PROPOSTAS DE TEXTOS INFORMATIVOS	145
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA INTERNATIONAL JOURNAL ANTIMICROBIAL AGENTS	149
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)	157
ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO	161

INTRODUÇÃO

O abscesso apical agudo (AAA) é uma reação inflamatória frente a uma necrose e infecção pulpar, caracterizado pelo início rápido, dor espontânea, sensibilidade do dente à percussão e pressão apical, formação de pus, e edema dos tecidos associados (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTICS – AAE, 2011).

A comunidade microbiana envolvida em casos de AAA é mista. De acordo com a literatura, os filos mais frequentemente detectados são *Firmicutes* (52%), *Fusobacteria* (17%) e *Bacteroidetes* (13%) (SANTOS et al., 2011). Embora nesse tipo de infecção haja um predomínio de bactérias anaeróbias estritas como *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* e *Porphyromonas endodontalis* (SIQUEIRA JÚNIOR, RÔÇAS, 2009); e que a presença de *Fusobacterium* spp., *Parvimonas* spp., *Atopobium* spp., *Dialister* spp., *Porphyromonas* spp. e *Prevotella* spp. esteja relacionada à dor, edema e exsudato purulento (SANTOS et al., 2011), certas espécies de bactérias anaeróbias facultativas também estão presentes e associadas a alguns sinais e sintomas (JACINTO et al., 2003; SAKAMOTO et al., 2006; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2013).

Bactérias anaeróbias facultativas são as bactérias que usam o oxigênio para obter a energia, mas podem crescer sem oxigênio. O papel desses micro-organismos em infecções endodônticas primárias com sintomatologia dolorosa ainda não está claro. Acredita-se que as bactérias anaeróbias facultativas sejam as responsáveis por preparar o ambiente para os micro-organismos anaeróbios estritos que predominam nesse tipo de infecção. Mölller et al. (1981) verificaram a presença de um maior número de bactérias anaeróbias facultativas como *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus epidermidis*, *Lactobacillus* spp. no início da infecção (1 a 7 dias); e um aumento de bactérias anaeróbias estritas após 6 a 7 meses de infecção. Os principais micro-organismos anaeróbios facultativos encontrados em casos de AAA são *Streptococcus* spp. (KHEMALEELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003; KURIYAMA et al., 2005; OZBEK et al., 2006; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2009; POESCHL et al., 2011; RÔÇAS; SIQUEIRA JÚNIOR; DEBELIAN, 2011; HSIAO et al., 2012), *Enterococcus* spp. (JACINTO et al., 2003; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2009; POESCHL et al., 2011; MONTAGNER et al., 2012), *Actinomyces* spp. (KHEMALEELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003; KURIYAMA et al., 2005; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2009), *Staphylococcus* spp.

(KHEMALLELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003; OZBEK et al., 2006; POESCHL et al., 2011), *Corynebacterium* spp. (KHEMALLELAKUL et al., 2002; OZBEK et al., 2006; POESCHL et al., 2011), *Eikenella* spp. (KHEMALLELAKUL et al., 2002; KURIYAMA et al., 2005; SIQUEIRA Jr.; RÔÇAS, 2009; POESCHL et al., 2011), *Lactobacillus* spp. (KHEMALLELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003).

Streptococcus spp. são cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos encontrados frequentemente na infecção endodôntica primária (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2009; SKUCAITE et al., 2010). As principais espécies isoladas em AAA são *Streptococcus mutans* (MUNSON et al., 2002; KHEMALEELAKUL et al., 2002; OZBEK et al., 2006), *Streptococcus oralis* (MUNSON et al., 2002; KHEMALEELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003; POESCHL et al., 2011), *Streptococcus anginosus* (MUNSON et al., 2002; JACINTO et al., 2003; OZBEK et al., 2006; POESCHL et al., 2011), *Streptococcus E1* (MUNSON et al., 2002), *Streptococcus sanguis* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003; POESCHL et al., 2011), *Streptococcus sobrinus* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Streptococcus mitis* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003; OZBEK et al., 2006; POESCHL et al., 2011), *Streptococcus gordonii* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; POESCHL et al., 2011), *Streptococcus crista* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Streptococcus grupo C* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Streptococcus pyogeneses* (OZBEK et al., 2006), *Streptococcus pneumoniae* (OZBEK et al., 2006), *Streptococcus constellatus* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003; POESCHL et al., 2011), *Streptococcus intermedius* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; POESCHL et al., 2011). Embora o número de cepas desse gênero não seja expressivo em casos de AAA, *Streptococcus* spp. está relacionado a presença de dor (FOUAD et al., 2002), sendo que o *Streptococcus constellatus* além da presença de dor, está associado à sensibilidade a percussão, presença de edema e de exsudato (SIQUEIRA JÚNIOR et al., 2002; JACINTO et al., 2003). Além disso, esses patógenos possuem um importante papel nesse tipo de infecção uma vez que são capazes de associar-se a outras espécies de micro-organismos, aumentando a patogenicidade da doença e assim contribuindo para o aumento da sintomatologia do hospedeiro (KHEMALEELAKUL et al., 2002; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2009). Khemallelakul et al. (2002) ao identificar a composição das comunidades microbianas em casos de AAA mostrou que em 53% dos casos houve uma associação entre os gêneros *Prevotella* e *Streptococcus*. Vale lembrar que espécies

de *Prevotella*, especialmente *P. intermedia*, estão associadas em casos de dentes com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa (JACINTO et al., 2003; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2013).

Enterococcus spp. são micro-organismos Gram-positivos e anaeróbios facultativos. Dentre as espécies de *Enterococcus* isoladas em casos de infecção endodôntica destacam-se *E. faecalis* (JACINTO et al., 2003; GOMES et al., 2006; SKUCAITE et al., 2010; POESCHL et al., 2011), *E. durans* (SKUCAITE et al., 2010). Comumente o *E. faecalis* está presente em casos de infecção persistente (PINHEIRO et al., 2003; SEDGLEY et al., 2006; SKUCAITE et al., 2010), devido a sua habilidade de formar biofilme (AL-AHMAD et al., 2010), e de desenvolver estruturas complexas sobre as paredes do canal radicular (DUGAN; SEDGLEY, 2007), resistindo aos efeitos da terapia endodôntica. Esses micro-organismos têm sido encontrados em casos de infecção primária (SKUCAITE et al., 2010; MONTAGNER et al., 2010; POESCHL et al., 2011). Gomes et al. (2006) avaliaram a presença de *E. faecalis* em casos de infecção primária e em casos de falha do tratamento endodôntico utilizando o método de cultura e o método molecular. De acordo com os resultados, o *E. faecalis* foi identificado tanto em infecção primária como em falhas no tratamento endodôntico. Contudo, o método molecular identificou um maior número de cepas de *E. faecalis* quando comparado ao método de cultura. Isso ocorre devido a maior sensibilidade dos métodos moleculares. Além disso, a presença de *Enterococcus* spp. em casos de AAA tem sido associada à edema (GOMES et al., 2004).

A literatura ainda destaca a presença de *Actinomyces* spp. e sua relação a sensibilidade à percussão (JACINTO et al., 2003). As espécies mais prevalentes de *Actinomyces* isoladas em casos de AAA são *Actinomyces israelii* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; OZBEK et al., 2006), *Actinomyces odontolyticus* (JACINTO et al., 2003), *Actinomyces viscosus* (JACINTO et al., 2003), *Actinomyces meyeri* (JACINTO et al., 2003), *Actinomyces naeslundii* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; OZBEK et al., 2006). Em relação aos gêneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Eikenella* e *Lactobacillus* as seguintes espécies foram isoladas *Staphylococcus saccharolyticus* (JACINTO et al., 2003), *Staphylococcus epidermidis* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; JACINTO et al., 2003; OZBEK et al., 2006; POESCHL et al., 2011), *Staphylococcus aureus* (OZBEK et al., 2006; POESCHL et al., 2011), *Staphylococcus capitis* (POESCHL et al., 2011), *Staphylococcus*

saprophyticus (KHEMALEELAKUL et al., 2002; OZBEK et al., 2006), *Staphylococcus haemolyticus* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Corynebacterium haemolyticum* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Corynebacterium xerosis* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; OZBEK et al., 2006), *Corynebacterium bovis* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Corynebacterium striatum* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Corynebacterium propinquum* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Corynebacterium striatum* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; OZBEK et al., 2006), *Corynebacterium diphtheriae* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Eikenella corrodens* (KHEMALEELAKUL et al., 2002; POESCHL et al., 2011), *Lactobacillus rhamnosus* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Lactobacillus fermentum* (KHEMALEELAKUL et al., 2002), *Lactobacillus casei* (KHEMALEELAKUL et al., 2002).

A virulência de uma cepa bacteriana pode contribuir para modular os aspectos clínicos da infecção. A virulência é definida como a capacidade infecciosa de um micro-organismo, medida pela mortalidade que ele produz e/ou por seu poder de invadir tecidos do hospedeiro; e é expressa por meio de fatores de virulência que são mecanismos que os micro-organismos tem para facilitar a aderência, a colonização, a resistência, a patogenicidade e a evasão da resposta imune do hospedeiro (MEDEIROS et al., 2014). O LPS (lipopolissacarídeo) presente em bactérias Gram-negativas é um exemplo de fator de virulência. De acordo com HORIBA et al. (1991) a presença dessa endotoxina no canal radicular tem correlação com dentes sintomáticos, dentes com radiolucência periapical e dentes com presença de exudato. Gomes et al. (2012) verificaram que a média da concentração de endotoxinas encontradas na infecção primária em dentes sintomáticos é maior quando comparado a dentes assintomáticos. Sousa et al. (2014) mostraram que há uma forte associação entre altos níveis de endotoxinas e AAA. Isso ocorre porque o LPS é um potente ativador da resposta imune celular.

Proteínas produzidas por algumas bactérias também são exemplos de fatores de virulência. Segundo Provenzano et al. (2013) as proteínas bacterianas identificadas podem ser classificadas de acordo com sua função biológica em: de transcrição e tradução, divisão celular/síntese de peptidoglicano, quimiotaxia, processo de DNA, metabolismo de energia, metabolismo de ácidos graxos, metanogênese, membrana, metabolismos de nucleotídeos, resistência a antibióticos, adesão, patogênese/virulência, proteólise, resposta ao estresse, transporte, biossíntese de vitaminas e outras/desconhecidas. A proteína de ligação ao colágeno

(collagen binding protein), detectada pela presença do gene *ace*, está relacionada ao estabelecimento do *E. faecalis* na dentina infectada (NALLAPAREDDY et al., 2000). As proteínas de superfície, detectada pela presença do gene *esp*, tem relação com a interação do *E. faecalis* dentro dos biofilmes (SHANKAR et al., 1999). A gelatinase, uma metaloproteinase hidrofóbica detectada pela presença do gene *gelE*, tem a capacidade de clivar insulina, caseína, hemoglobina, colágeno, gelatina e fibrina (FRANZ et al., 2003).

Outros exemplos de fatores de virulência são: o ativador da hemolisina, detectado pela presença do gene *cyIA* (GILMORE et al., 1994); a substância de agregação (aggregation substance) detectada pela presença do gene *asa* e *asa 373* (CHOW et al., 1993); antígeno da endocardite (antigen endocarditis) detectado pela presença do gene *efaA* (LOWE; LAMBERT; SMITH, 1995). Lins et al. (2013) determinaram as características fenotípicas e moleculares de *E. faecalis* isolados de canais radiculares com infecção primária. Além disso, os resultados mostraram uma alta prevalência dos genes *gelE*, *esp* e *agg*. As cepas foram sensíveis para penicilina G (PG), eritromicina (EM) e vancomicina (VAN). Em 2016, Barbosa–Ribeiro et al. investigaram a prevalência de fatores de virulência e a resistência a antimicrobianos de *E. faecalis* isolados de dentes com falha no tratamento endodôntico. Fatores de virulência (*ace*, *asa*, *asa373*, *cyIA*, *efaA*, *esp* e *gelE*) foram detectados por meio da reação da cadeia da polimerase (polymerase chain reaction – PCR). De acordo com os resultados, o gene *ace* foi detectado em 100% das cepas isoladas, os genes *asa* (60%), *asa373* (15%), *efaA* (95%), *esp* (70%), e *gelE* (75%); por sua vez o gene *cyIA* não foi detectado. Em relação à resistência bacteriana, a associação de amoxicilina + ácido clavulânico (XL) foi mais eficaz.

No entanto, a presença de espécies com diferentes tipos clonais pode resultar em padrões de virulência díspares (ÖZMERIÇ; PREUS; OLSEN, 2000). Tal fato, ajuda a explicar porque alguns micro-organismos podem ser encontrados tanto em infecções sintomáticas como assintomáticas (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2013), por exemplo o *E. faecalis*. Diante disso, diferentes métodos tem sido propostos para avaliar a diversidade genotípica de diferentes espécies.

PCRs utilizando *primers* arbitrários (AP-PCR), como OPA-02, tem sido empregada em estudos de cariologia para avaliar os genotipos de *Streptococcus* spp., especialmente *Streptococcus mutans* (NASCIMENTO et al., 2004; ARTHUR et al., 2007; ZHOU et al., 2011). Cada *primer* gera amplicons de diferentes espectro,

indicando o polimorfismo do *Streptococcus* spp. O repetitive extragenic palindromic-PCR (REP-PCR) faz uso de sequências oligonucleotídicas iniciadoras de sequências de DNA repetidas no genoma da maioria das bactérias. Esse método tem sido utilizado avaliar a diversidade genotípica de *Streptococcus* spp. (PADDICK et al., 2005; MOMENI et al., 2013), *Actinomyces* spp. (PADDICK et al., 2005), e *Enterococcus* spp. (DELBONI et al., 2017). Delboni et al. (2017) utilizaram o REP-PCR e o AP-PCR para avaliar a diversidade e similaridade genotípica de *E. faecalis* isolados de diferentes sítios orais. As amostras foram coletadas da saliva, câmara pulpar e canal radicular de dentes tratado endodonticamente, mas com periodontite apical. A interpretação dos resultados do REP-PCR foi similar aos obtidos pelo AP-PCR. Sete genótipos de *E. faecalis* foram observados entre os 74 isolados em 3 diferentes sítios. Dos sete genótipos, seis estavam presentes nos canais radiculares; e quatro estavam presentes no canal radicular, na câmara pulpar e na saliva. Embora o REP-PCR seja um método rápido e de baixo custo, ele possui um menor poder discriminatório quando comparado a eletroforese por gel pulsátil (Pulsed-Field Gel Electrophoresis - PFGE) (ZOLETTI et al., 2011). Esse fato também foi verificado por Crnich et al. (2014) ao avaliar *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – MRSA).

O PFGE é um método que utiliza enzimas de restrição para separar grandes fragmentos de DNA bacteriano. A visualização dos fragmentos de DNA é realizada após a corrida das amostras (DNA + enzima) em uma matriz de gel em um campo elétrico que muda periodicamente de direção. Outro método que tem sido usado é a tipagem de sequenciamento multilocus (*Multilocus Sequence Typing* - MLST). O MLST revela a diversidade genética entre os isolados da mesma espécie com base na similaridade dos genes *housekeeping*; e tem como vantagem o fato de permitir a comparação dos resultados por meio de bases de dados eletrônicas, disponíveis na internet. Pinheiro et al. (2006) avaliaram a diversidade genotípica de *E. faecalis* isolados de canais radiculares com tratamento endodôntico e lesão periapical, utilizando o PFGE e a sequência de DNA dos genes *ace* e *salA* - MLST. Vinte e duas cepas de *E. faecalis* foram isoladas. Os resultados do PFGE mostraram 18 perfis de macrorrestrição, sendo que após a análise dos genes 13 genótipos foram identificados. Pinheiro et al. (2012) investigaram a correlação entre linhagens distintas de *E. faecalis* e o polimorfismo *capsule locus* (CPS). A presença da cápsula tem sido associada a linhagens patogênicas de *E. faecalis*. Os tipos de CPS foram

determinados por PCR e as linhagens de *E. faecalis* por meio do MLST utilizando 7 genes. Os dados obtidos revelaram que 37,5% dos isolados de *E. faecalis* produziram genes para produção da cápsula, sendo que 16,7% foram classificados como CPS tipo 2. O MLST revelou diversidade genética entre os isolados. Os isolados classificados pelo MLST no cluster A pertencentes ao CPS tipo 2 formam uma linhagem com potencial altamente patogênica. Em 2013, Penas et al. avaliaram linhagens genéticas de *E. faecalis* isoladas de canais radiculares e de infecções sistêmicas por meio do MLST e polimorfismo *capsule locus* (CPS); e sua correlação com genes de virulência. Os genes de virulência *esp*, *cylB*, *gls24-like*, *nuc1*, *psA* e *cbb* foram investigados utilizando PCR. As linhagens de *E. faecalis* foram avaliadas por meio do MLST (7 genes) e pela presença de genes para produção de cápsula utilizando PCR. De acordo com os resultados, os isolados de canais radiculares apresentaram maior diversidade e menor virulência quando comparado aos isolados de infecções sistêmicas. Os isolados endodônticos apresentaram 1 ou 2 genes de virulência, enquanto que os isolados sistêmicos apresentaram pelo menos 3 genes dos 6 avaliados. Além disso, 13 dos 19 isolados sistêmicos apresentaram genes para produção da cápsula. Vale lembrar que os relatos da literatura avaliaram a diversidade fenotípica e genotípica de cepas de *E. faecalis*, isoladas de diferentes casos clínicos (PINHEIRO et al., 2006; PINHEIRO et al., 2012; PENAS et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre a diversidade fenotípica e genotípica encontrada em múltiplas cepas de um mesmo paciente.

A terapia local para casos de abscesso apical agudo consiste em drenagem (via canal radicular ou cirúrgica) e realização de tratamento endodôntico ou exodontia. Por sua vez, a terapia antibiótica sistêmica é indicada como terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico nos casos em que os pacientes apresentam sintomatologia dolorosa associada a edema progressivo, difuso e sinais sistêmicos de infecção como febre, mal-estar e linfadenopatia, ou em pacientes que apresentam maior risco de infecção secundária resultante de bacteremia (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2013).

Antibióticos são substâncias químicas, naturais ou sintéticas, com capacidade de impedir a multiplicação de bactérias ou de as destruir, não tendo contudo eficácia contra vírus. Desde a sua introdução, várias classes desses medicamentos estão disponíveis, incluindo sulfonamidas e trimetoprim, penicilinas, cloranfenicol, tetraciclina, colimicina, macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, rifamicinas,

glicopeptídeos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, oxazolidinoas, glicilglicinas, lipoglicopeptídeos, e suas variações (ZINNER, 2007).

A seleção de um antibiótico deve envolver o medicamento apropriado na dosagem correta e duração adequada para erradicar micro-organismos no local da infecção, minimizando eventos adversos para o paciente e a seleção de bactérias resistentes (ZINNER, 2007). Além disso, considerações clínicas como alergia a drogas, interações medicamentosas, fatores que indiquem regime especial de prescrição, via de prescrição, seguimento do tratamento, vantagens na utilização da associação de antibióticos, e menor custo tem influencia na escolha correta de antibiótico para um determinado paciente (WANMACHER; FERREIRA, 1999; ZINNER, 2007).

Os antibióticos beta-lactâmicos (β -lactâmicos), especialmente as penicilinas, que atuam inibindo a síntese da parede celular (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006), têm sido tradicionalmente recomendado como os antibióticos de primeira escolha no manejo de infecções endodônticas agudas (KURIYAMA et al., 2000). De acordo com Siqueira Júnior e Rôças (2013), considerando que a infecção endodôntica aguda é uma infecção polimicrobiana, deve-se preferir empregar agentes antimicrobianos cujo espectro inclua as bactérias mais frequentemente detectadas. Ademais, os antibióticos β -lactâmicos são agentes bactericidas de baixa toxicidade para eucariondes (GEORGOPAPADAKOU, 1993).

Flynn (2011) realizou uma revisão sistemática para determinar quais seriam os antibióticos de escolha para o manejo de infecções odontogênicas e quanto tempo deveria durar o tratamento. O autor concluiu que os antibióticos β -lactâmicos deveriam ser os antibióticos de escolha, uma vez que possuem um perfil de segurança excelente, contando que seja descartada a ocorrência de reação alérgica por meio de história médica completa do paciente. Além disso, os custos da penicilina V e amoxicilina são baixos quando comparado a outros antibióticos. Em comparação a penicilina V, a amoxicilina é ligeiramente menos dispendiosa e o seu regime posológico é mais confortável, devido ao seu intervalo de dosagem mais longo. O autor também verificou que em situações nas quais se observa alergia à penicilina, a clindamicina deve ser o fármaco de escolha por razões de segurança.

Em 2017, a Sociedade Européia de Endodontia (SEGURA-EGEA et al., 2017) publicou uma recomendação quanto ao uso de antibióticos em endodontia. Segundo os autores, os antibióticos β -lactâmicos (penicilina V ou amoxicilina associada ou

não ao ácido clavulânico) devem ser os antibióticos de escolha para o tratamento coadjuvante de infecções endodônticas. Nos casos em que a penicilina V for ineficaz, recomenda-se a sua associação ao metronidazol. A clindamicina, a claritromicina e a azitromicina são indicados para pacientes alérgicos.

No entanto, segundo a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO) houve um aumento da resistência bacteriana aos antibióticos tanto na medicina, como na odontologia nos últimos anos (WHO, 2014). Em 2011, Gomes et al. analisaram a resistência antimicrobiana de algumas espécies de anaeróbios isolados de infecções endodônticas, ao longo do tempo, em uma região do Brasil. De acordo com os resultados, houve aumento da resistência a antibióticos dos isolados ao longo dos anos, em uma população específica. Entre as possíveis razões para o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos estão prescrições inapropriadas, uso inadequado pelos pacientes, diagnósticos limitados, venda não autorizada, falta de mecanismos adequados para regulamentação de medicamentos em utilização, e uso em não humanos (DE PAULA et al., 2014; MARRA et al., 2015; AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017).

Em virtude disso, em 2015, a WHO criou um plano de ação global sobre resistência antimicrobiana. Esse plano tem como objetivo melhorar a consciência e a compreensão da resistência antimicrobiana por meio da comunicação, educação e treinamento; fortalecer o conhecimento e a base de evidências por meio da vigilância e da pesquisa; reduzir a incidência de infecção por meio de saneamento efetivo, higiene e medidas de prevenção de infecção; otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos em humanos e animais; e desenvolver investimentos sustentáveis que leve em consideração as necessidades de todos os países e aumente o investimento em novos medicamentos, ferramentas de diagnóstico, vacinas e outras intervenções.

A resistência bacteriana é definida como a habilidade de um micro-organismo para suportar os efeitos dos antibióticos (RODRIGUEZ-NÚÑEZ et al., 2009). Ela pode ser classificada como natural (intrínseca) ou adquirida. A resistência natural é aquela inerente à célula bacteriana, determinada pela dificuldade de permeabilidade das superfícies externas das células bacterianas. Já a resistência adquirida, resulta quando cepas originalmente sensíveis tornam-se resistentes devido a uma alteração genética determinada por mutações ou aquisição de plasmídios (SILVA, 2002).

A resistência de bactérias anaeróbias facultativas aos agentes β -lactâmicos pode ocorrer em virtude da alteração das proteínas de ligação à penicilina (penicillin-binding proteins-PBPs), da produção de penicilases (β -lactamase). *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp. são exemplos de bactérias que podem sofrer alteração das PBPs, e assim reduzir a sua afinidade por esses agentes (DOWSON; HUTCHISON; SPRATT, 1989; FONTANA et al., 1992; SMITH et al., 1993; SMITH; KLUGMAN, 1995; NAKAYAMA; TAKAO, 2003; SMITH; JACKSON; KENNEDY, 2004). Além disso, *Enterococcus* spp. podem tornar-se resistente aos antibióticos β -lactâmicos devido à produção de β -lactamase (MURRAY et al., 1992). β -lactamases são enzimas bacterianas que hidrolizam o anel beta-lactâmico e assim inativam a ligação do antibiótico (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006). Contudo, a presença dessa enzima em isolados clínicos, não garante que esses isolados sejam resistentes para todos os antibióticos β -lactâmicos. A produção de β -lactamase também conferem resistência de *Staphylococcus* spp. à penicilina. Essas enzimas são codificadas geneticamente em plasmídeos transmissíveis por transdução (BAUER; PERRY; KIRBY, 1960).

Em relação a resistência de anaeróbios facultativos ao grupo dos macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B (MLS_B), a literatura destaca três mecanismos para *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp.: modificação no alvo de ligação no ribossomo; efluxo ativo, ou inativação enzimática da droga como a presença da enzima metilase (LECLERQ; COURVALIN, 1991; LECLERQ, 2002; VAN LEER BUTER et al., 2010). Já *Enterococcus* spp. são intrinsecamente resistentes a clindamicina (KRISTICH; RICE; ARIAS, 2014).

O padrão de resistência bacteriana a antibióticos vem sendo determinado por meio de testes *in vitro* que avaliam a sua eficácia e por meio de testes *in vivo* que monitoram a sua eficácia (ARAF, 2000). Entre os métodos utilizados para prever a eficácia dos antibióticos pode-se citar: diluição em ágar, microdiluição em caldo, difusão em disco e Epsilometer Test (E-test) (AB Biodisk, Culver City, CA, EUA) (OLSSON-LILJEQUIST; NORD, 1994). Em relação aos métodos que monitoram a eficácia são comumente empregados o teste inibitório do serum e a determinação dos níveis de antibióticos no sangue (ARAF, 2000).

O método de diluição em ágar consiste na incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas de um agente antibiótico às placas individuais de petri contendo meio de cultura. O método de microdiluição em caldo emprega antibióticos

liofilizados ou congelados em distintas concentrações numa placa de 96 poços. Já o método de difusão em disco consiste na difusão de antibióticos contido em um disco em ágar. O método E-test baseia-se na difusão em ágar de um gradiente de concentração antimicrobiana contínua, exponencial a partir de uma tira de plástico que contém o antibiótico (BAUMGARTNER; XIA, 2003).

Os métodos de diluição em ágar e E-test baseiam-se na resposta do micro-organismo frente às diferentes concentrações de antibióticos encontradas no sangue ou tecidos, obtidas após a utilização do fármaco pelo paciente (*National Clinical and Laboratorial Standards Institute – NCLSI, 2012*). Assim, a concentração inibitória mínima (*Minimum Inhibitory Concentration – MIC*) determina a menor concentração de um agente antibiótico capaz de inibir completamente o crescimento de um micro-organismo visível; e o patógeno é categorizado em “sensível”, “intermediário” e “resistente”. Embora a MIC seja utilizada para determinar a sensibilidade a antibióticos, o método de diluição em ágar é considerado trabalhoso (OLSSON-LILJEQUIST; NORD, 1994). Além disso, as placas contendo antibióticos não podem ser armazenadas antes do uso pois podem perder a atividade antimicrobiana. Já o E-test pode ser considerado o método *in vitro* ideal para avaliar a sensibilidade a antibióticos. Ele é um método quantitativo, flexível, não trabalhoso quando comparado ao método de diluição em ágar e de leitura confiável (OLSSON-LILJEQUIST; NORD, 1994). Contudo, o seu custo ainda é elevado se comparado aos demais testes.

Frente ao que foi exposto, a presente tese foi conduzida com os objetivos de analisar o padrão de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de infecções endodônticas agudas por meio de uma revisão sistemática e meta-análise; identificar bactérias anaeróbias facultativas isoladas em casos de abscesso apical agudo e determinar a sua diversidade genotípica, a sua sensibilidade antimicrobiana e a presença de fatores de virulência; e realizar, por meio de uma proposta de difusão de conhecimentos, orientações de uso de agentes antibióticos em infecções endodônticas agudas.

CAPÍTULO 1

Resistance profiles to antimicrobial agents in bacterial isolates from acute endodontic infections – systematic review and meta-analysis

Pauline Mastella Lang – DDS, MSc, PhD Student, Federal University of Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brazil.

Rogério de Castilho Jacinto – DDS, MSc, PhD, Assitant Professor, Endodontic Division, Department of Restorative Dentistry, State University of São Paulo, Araçatuba, SP, Brazil.

Tatiane da Silva Dal Pizzol - PharmD, MSc, PhD. Associate Professor, Post-Graduation Program in Epidemiology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Maria Beatriz Cardoso Ferreira – MD, MSc, PhD, Professor, Department of Pharmacology, Institute of Health Basic Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brazil.

Francisco Montagner – DDS, MSc, PhD, Assistant Professor, Endodontic Division, Department of Conservative Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brazil.

Correspondence Author

Dr Francisco Montagner
Federal University of Rio Grande do Sul
Department of Conservative Dentistry - Endodontic Division
Rua Ramiro Barcellos, 2492. – Bairro Santana.
Porto Alegre, RS – Brazil.
90035-003
E-mail: francisco.montagner@ufrgs.br
Phone: +55 51 3308 5430

* Artigo publicado na revista *International Journal of Antimicrobial Agents* (Qualis A1, Factor de impacto 4.307) (**ANEXO I**).

ABSTRACT

The infected root canal or the acute apical abscess when it exudates can harbor several species, belonging to the genus *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Parvimonas* spp., *Streptococcus* spp., *Treponema* spp., and *Olsenella* spp. and yet-non-cultivable species. A systematic review and a meta-analysis were performed in order to assess the resistance rates to antimicrobial agents in clinical studies that isolated bacteria from acute endodontic infections. The electronic databases and the gray literature were searched up to May 2015. The clinical studies in of humans that have evaluated the antimicrobial resistance of the isolates of primary acute endodontic infections through laboratorial methods were included. PRISMA guidelines were followed. A random effect meta-analysis was employed. The outcome was described as being the pooled resistance rates for each antimicrobial agent. Heterogeneity and sensitivity analyzes were performed. Subgroup analyzes were conducted based upon the report, or not, for the use of antibiotics prior to sampling; this was an exclusion factor (Subgroup A and B, respectively). The data from 7 studies was extracted. The resistance rates for 15 different antimicrobial agents were evaluated, ranging from 3.5% to 40.0%. Lower resistance rates were observed for amoxicillin+clavulanate and amoxicillin alone; higher resistant rates were detected for tetracycline. The resistance rates varied according to the previous use of an antimicrobial agent, as demonstrated by the subgroup analyzes. Heterogeneity was observed for the resistance profiles of penicillin G in Subgroup A; it was also observed for amoxicillin, clindamycin, metronidazole and tetracycline in Subgroup B. Sensibility analyzes demonstrated that the resistance rates changed for metronidazole, clindamycin, tetracycline and amoxicillin. These findings have suggested that clinical isolates had a low resistance to lactamic agents. Further well-designed studies are needed in order to clarify whether the differences in the susceptibility among the antimicrobial agents may influence the clinical responses to the treatment.

KEY-WORDS: Antimicrobial agents. Susceptibility. Acute endodontic infections. Periapical abscess. Meta-analysis.

1. INTRODUCTION

Endodontic infections occur due to caries or dental trauma if bacteria gain access to the necrotic dental pulp or the periradicular tissues and produce a disease such as opportunistic pathogens [1,2]. The infected root canal or the acute apical abscess when it exudates can harbor several species, belonging to the genus *Fusobacterium* spp., *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Parvimonas* spp., *Streptococcus* spp., *Treponema* spp. and *Olsenella* spp., and yet-non-cultivable species [3,4]. Despite the broad number of species that have been isolated/detected in acute endodontic infections, the microbial profiles in these communities show few shared species and a great diversity among the subjects [5]. Only the strict anaerobes of *Olsenella profusa* and the taxon *Dialister* E1 were detected in all of the samples that were analyzed by Jacinto et al., [6] and Munson et al., [7], respectively. However, *Tannerella forsythia*, *Shuttleworthia satelles*, and *Filifactor alocis* [6], were only detected in one sample. The interactions among the biofilm community members are responsible for the presence of painful symptomatology [8,9]. Clinical signs and symptoms have been associated with specific bacterial species: pain and *P. micros*, *P. intermedia/nigrescens* and *Eubacterium* spp.; a tenderness to percussion and *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* and *Fusobacterium* spp.; swelling and *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* and *Fusobacterium* spp. [3].

The clinical management of an acute endodontic infection involves a root canal debridement and local drainage, whenever possible. In specific situations, antibiotics can be prescribed as a complementary measure, especially for abscesses that are associated with a systemic involvement, including fever, malaise and lymphadenopathy; disseminating infections resulting in cellulitis, progressive diffuse swelling, and/or trismus; and abscess in systemically compromised patients who are at an increased risk of a secondary infection following bacteremia [2]. The choice of an antibiotic is usually based upon previously published susceptibility, testing and clinical trials [1]. The β -Lactam antibiotics, especially penicillin, have been recommended as being the first-line of antibiotics because they work well against most causative bacteria and because penicillin has a low incidence of side effects [10,11]. The clindamycin drug has often been recommended in cases of an allergy to penicillin or when penicillin has not been effective [10-12]. In the last mentioned clinical situation, the β -lactamase inhibitors, such as clavulanic acid, in a combination

with amoxicillin, have also been indicated to extend the spectrum of coverage [10,11].

The emergence of antibiotic-resistant bacterial strains has increased, especially due to the excessive and incorrect use of these particular agents [13]. Gomes et al., [14] reported the increase of a resistance among anaerobic bacteria that was isolated from primary endodontic infections, throughout a 9-year-period in a specific Brazilian population. The rational prescription of antimicrobial agents must be based on the resistance pattern of the microorganisms, the characteristics of the patient (immunosuppression, a previous report of an allergy) and the drug's characteristics (cost, effectiveness, adverse effects). From a microbiological point-of-view, it requires a comprehensive analysis of the resistance profiles among microbial isolates from endodontic infections. Recently, Moraes et al., [15] performed a systematic review in order to describe the presence of resistance genes to antimicrobial agents in oral environments such as saliva, dental biofilm and endodontic infections. However, there is a lack of information if the microbial isolates from endodontic infections express those virulence factors that are conveyed a resistance to antimicrobial agents.

Therefore, the aim of this systematic review and meta-analysis was to depict the antimicrobial resistance profiles of bacterial isolates from primary acute endodontic infections as reported in the current literature.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Focused PICO Question

A systematic review was performed by using the check-list items as reported by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) [16]. The proposed PICO question was: "What are the resistance rates to antimicrobial agents in studies that have isolated bacteria from those patients with acute endodontic infections?"

2.2 Eligibility criteria

The clinical studies that have evaluated the resistance antimicrobial of the activity bacterial isolates to primary acute endodontic infections by disc diffusion or E-test methods in humans were included in the survey.

2.3 Search Strategy and Information Sources

Electronic searches were performed in The PubMed Database, The Cochrane Library (All Results), ISI Web Database, Scopus, LILACS, OpenGrey, sciELO, the CAPES Database, the Grey Literature Report, Curtin University, GreyNet International and the Grey Literature Dentistry Database. Hand searching was independently and extensively performed by two authors (PML and FM) in the reference section of the selected studies and the available systematic reviews. No language restriction was applied to the search, except for ISI Web. The search comprised of those articles that had been published from the inception of the database to May 2015. **Figure A. 1** describes the search strategies that were adopted in the study for the PubMed database. This strategy was also employed and adapted for the other databases.

```
((("dental pulp cavity"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "pulp"[All Fields] AND "cavity"[All Fields]) OR "dental pulp cavity"[All Fields] OR ("root"[All Fields] AND "canal"[All Fields]) OR "root canal"[All Fields]) OR ("periapical abscess"[MeSH Terms] OR ("periapical"[All Fields] AND "abscess"[All Fields]) OR "periapical abscess"[All Fields])) AND ("microbial sensitivity tests"[MeSH Terms] OR ("microbial"[All Fields] AND "sensitivity"[All Fields] AND "tests"[All Fields]) OR "microbial sensitivity tests"[All Fields] OR ("microbial"[All Fields] AND "sensitivity"[All Fields] AND "test"[All Fields]) OR "microbial sensitivity test"[All Fields]) AND "humans"[MeSH Terms]
```

Figure A. 1 The search strategy adopted that was for the study, presenting the MeSH keywords and the search terms for the antimicrobial activity and the resistance of bacterial isolates to acute endodontic infections, as performed in the Pubmed database and adapted for the other databases.

The following limits were used for the ISI Web database: Database (Web of Science™ Core Collection, Biological Abstracts® and the SciELO Citation Index); Areas of Research (Dentistry and Oral Surgery Medicine, Infectious Diseases, Pharmacology Pharmacy, Microbiology); Document Type (article); and Language (English, Portuguese and Spanish).

2.4 Study Selection and Data Collection Process

After the title review and the abstract selection, full-text articles were revised based upon the following inclusion criteria: clinical studies in humans that had evaluated the antimicrobial activity resistance of bacterial isolates to primary acute endodontic infections by disc diffusion or E-test methods. The exclusion criteria comprised of: (1) Studies that did not specify the cause of the odontogenic abscess or the odontogenic infections (if endodontic or not) or that did not specify the microbial susceptibility results for each source of infection; (2) Studies that did not specify whether the endodontic infection is was acute or chronic; (3) Studies that did not report the method used to evaluate the antimicrobial resistance or if they used another method. After reading the included articles, an independent manual search was performed by two authors (PML and FM) in the References Section and for the Authors of the selected articles.

Data regarding the research group, the number of subjects included in the study, the antibiotic exposure as an exclusion criteria, the microbial source/sampling, the methods to measure the outcomes, the antimicrobial agents tested, bacterial genus, the number of bacterial strains, and the number of resistant strains, were all collected from the studies.

The overall resistance percentage of a specific antimicrobial agent was calculated for each study, despite the bacterial species tested. The overall percentage of resistance for each tested antimicrobial agent that was resulted from the average between the total number of resistant strains and the total number of tested strains. The strains that had an intermediate profile were considered susceptible to the antimicrobial agent. According to the CLSI Standards [17], the “intermediate” category included isolates with MICs of an antimicrobial agent that approached usually attainable blood and tissue levels, and for which response rates may have been lower than that of the susceptible isolates. It implied a clinical efficacy

in body sites where the drug was physiologically concentrated or when a higher than normal dosage of a drug was used. It also included a buffer zone, which would have prevented small, uncontrolled, technical factors from causing major discrepancies in the interpretations, especially for those drugs with narrow pharmacotoxicity margins.

2.5 Statistical Methods for Meta-Analysis

The statistical analysis was performed in order to evaluate the resistance profiles of the clinical isolates from the primary acute endodontic infections to the antimicrobial agents by the Comprehensive Meta-Analysis software version 3.3.070 (CMA, Biostat, Englewood, CO, USA).

A random effect meta-analysis model was used in order to estimate the combined effect. The outcome was described as the pooled resistance rates for each antimicrobial agent and was shown by the Forest plot. The degree of heterogeneity was analyzed by using the X^2 test and the I² statistic test, including all of the selected studies for the meta-analysis. A sensitivity analysis was performed by removing those studies with the greatest sample size [18,19], in order to evaluate the robustness of the results. A subgroup analysis was performed that was based on the report or not of the use of antibiotics prior to collection as an exclusion factor in the original study. Subgroup A comprised of studies that reported the previous use of antimicrobial agents as an exclusion factor [20,21]. Subgroup B included those studies that did not report on the previous use of an antimicrobial agent as an exclusion factor [12,18,19,22,23].

3. RESULTS

The results of the search strategy are presented in **Figure B. 1**. The final results of the search in The Cochrane Library, The ISI Web Database, The Medline Database (via PubMed), and Scopus were 1, 11, 15 and 24 publications, respectively. Several studies were shared in more than one database (Medline vs. ISI Web = 6; Medline vs. Scopus = 15; Scopus vs. ISI Web = 9). By the implementation of the inclusion and exclusion criteria, six studies were included and twenty studies were excluded (**Table A. 1**). The reasons for their exclusion are

shown in **Table A. 1**. One additional study was considered relevant by the hand search.

Information about the selected studies is shown in **Tables A. 2, A. 3, A. 4** and **A. 5**. The studies were performed over different periods of time (2002-2014) and the samples were collected in Japan, the United States, Brazil, and European countries. No selected study mentioned having conducted a sample size calculation; no study described how the recruitment was conducted. Two selected papers [19,20] reported no conflict of interest. The samples were collected from the root canals (symptomatic) and the apical swelling. The great majority of the studies had not adopted the previous exposure to antimicrobial agents as an exclusion criterion. Descriptive statistics were reported in all publications.

The data from seven studies were extracted. A total of 15 different antimicrobial agents had been evaluated in the selected studies and were as follows: penicillin, amoxicillin, amoxicillin + clavulanic acid, ampicillin, piperacillin-tazobactam, clindamycin, metronidazole, erythromycin, azythromycin, cephacloz, cephalosporin, cefoxitin, vancomycin, imipenem and tetracycline. The results of the meta-analysis are shown in the **Figures C. 1** and **C. 2**. The data is summarized in **Table A. 6**.

The overall resistance rates ranged from 3.5% to 40.0% for the microorganisms that were isolated from acute endodontic infections (**Table A. 6**). After the sensitivity analysis, excluding the study of Kuriyama et al., [18], the overall resistance rate was 9.5%, 23.2%, 25.4% and 64% of the isolates to metronidazole, erythromycin, clindamycin and tetracycline, respectively. The sensitivity analysis, excluding the study of Poeschel et al., [19], the overall resistance rate was 4.9%, 4.3%, 12.9% of the isolates to amoxicillin, amoxicillin + clavulanic acid and penicillin G, respectively.

The subgroup analysis showed that the resistance rates ranged from 6.9% to 82.9% for the studies that excluded the previous use of antimicrobial agents as being an exclusion factor in the original study. However, it ranged from 1.4% to 21.7% for the studies that did not report, or did not exclude, the previous use of antimicrobial agents.

The study observed heterogeneity in the resistance rates for penicillin G (Q-value=9.479; P=0.002) among the studies that reported the exclusion of the previous use of antimicrobial agents as being an exclusion factor (Subgroup A). The same behavior was not observed for amoxicillin + clavulanic acid (Q-value=3.011;

P=0.083). In Subgroup A, the heterogeneity analysis was not performed for clindamycin, erythromycin, metronidazole, tetracycline, and amoxicillin, because only one study included it (**Figure C. 1**). Heterogeneity was also observed for amoxicillin (Q-value=9.809; P=0.02), clindamycin (Q-value=43.906; P=0.000), metronidazole (Q-value=15.536; P=0.001) and tetracycline (Q-value=33.7; P=0.000), among those studies that had not reported the previous use of antimicrobial agents as being an exclusion factor (Subgroup B). In this subgroup, penicillin G (Q-value=3.519; P=0.172), penicillin V (Q-value=3.161; P=0.075), amoxicillin + clavulanic acid (Q-value=1.683; P=0.641) and erythromycin (Q-value=6.204; P=0.102), did not show heterogeneity among the resistance rates in the articles belonging to Subgroup B and that did not report the previous use of antimicrobial agents as being an exclusion factor (**Figure C. 2**).

A random effect meta-analysis model was not performed for cephaclor, tetracycline, cephazolin, ampicillin, azithromycin, vancomycin, imipenem, ceftioxin and piperacillin-tazobactam, because they were only mentioned in a single study [21]. The resistance rates to these antimicrobial agents are shown in **Table A. 5**.

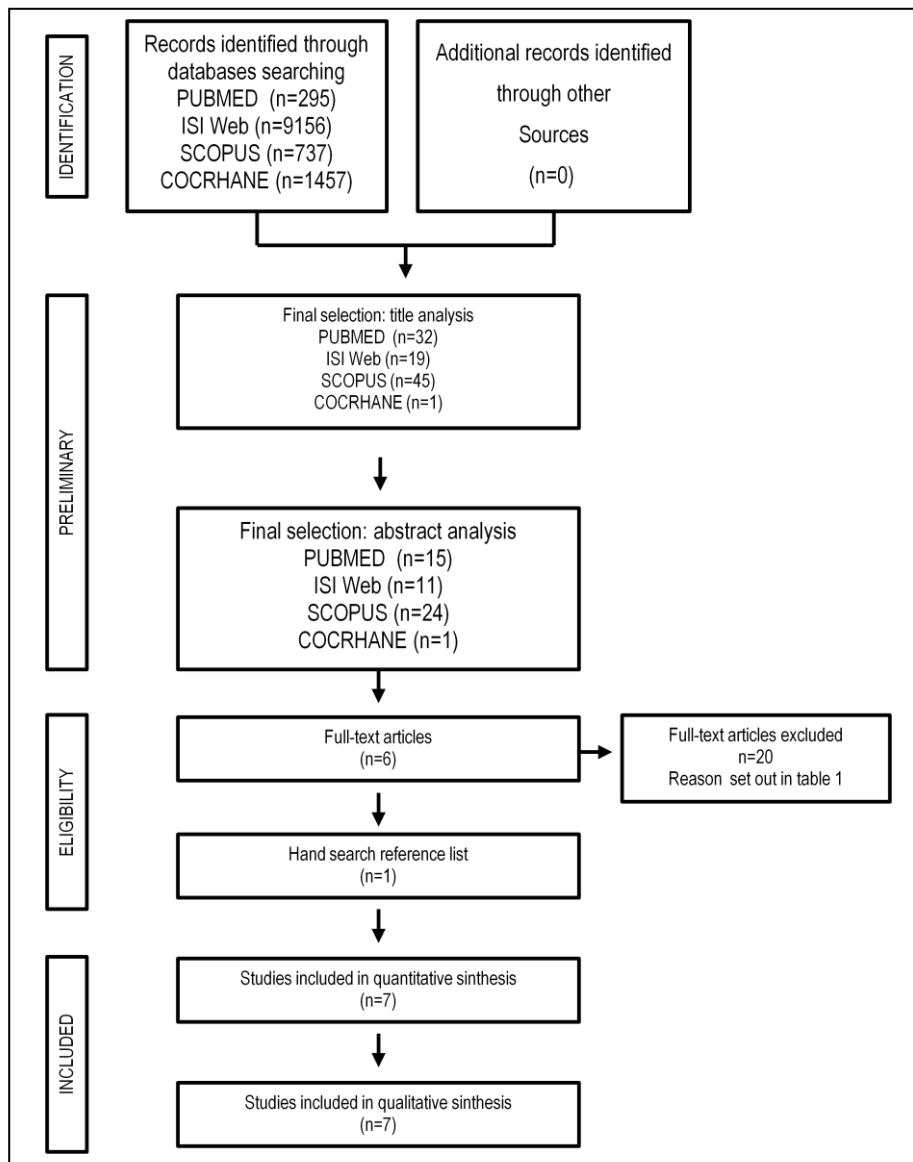


Figure B. 1 The flow diagram of the search strategy was developed to find studies that were related to the antimicrobial activity resistance of bacterial isolates to acute endodontic infections.

Table A. 1 - Excluded articles after the full-text analysis and exclusion criteria (n=20).

Author/year	Country	Title	Oral Site	Criteria
Driden et al. (1975) [24]	USA	Incidence of antibiotic resistance in microorganisms isolated from root canals	Root canal	(2)
Dave & Jhala (1975) [25]	India	Antibiotic sensitivity of the isolates of dento-alveolar abscesses	Tooth socket	(2)
Epstein & Scopp (1977) [26]	USA	Antibiotics and the intraoral abscess	Root canal or Tissue swelling	(3)
Lewis et al. (1988) [27]	Scotland	Reliability of sensitivity testing of primary culture of acute dentoalveolar abscess.	Tissue swelling	(1)
Lewis et al. (1989) [28]	UK	Antibiotic susceptibilities of bacteria isolated from acute dentoalveolar abscess	Tissue swelling	(1)
Yamamoto et al. (1989) [29]	Japan	Antimicrobial susceptibilities of <i>Eubacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , and <i>Bacteroides</i> isolated from canals of teeth with periapical pathosis	Root canal	(3)
Roche & Yoshimori (1997) [30]	USA	<i>In-vitro</i> activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses.	Tissue swelling	(1,3)
Goumas et al. (1997) [31]	Greece	Periapical abscesses: causal bacteria and antibiotic sensitivity	Tissue swelling	(3)
Kuriyama et al. (2000) [32]	Japan	Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections	Tissue swelling	(1)
Baumgartner & Xia (2003) [33]	USA	Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses.	Tissue swelling	(2)
Chan & Chan (2003) [34]	Taiwan	Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan.	Tissue swelling	(1)

(1) Studies that did not specify the cause of odontogenic abscess or odontogenic infections (if endodontic or not) or that did not specify the microbial susceptibility results for each source of infection; (2) Studies that did not specify whether the endodontic infection is acute or chronic; (3) Studies that did not report the method used to evaluate the antimicrobial resistance or used another methods other than E-test or disc diffusion.

Table A. 1 - Excluded articles after the full-text analysis and exclusion criteria (n=20) (continuation).

Author/year	Country	Title	Oral Site	Criteria
Jacinto et al (2006) [35]	Brazil	Incidence and antimicrobial susceptibility of <i>Porphyromonas gingivalis</i> isolated from mixed endodontic infection.	Root canal	(2)
Blandino <i>et al.</i> (2007) [36]	Italy	Antimicrobial susceptibility and β -Lactamase production of anaerobic and aerobic bacteria isolated from pus specimens from orofacial infections.	Tissue swelling	(1)
Warnke <i>et al.</i> (2008) [37]	Germany	Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses.	Tissue swelling	(1)
Jacinto et al. (2008) [38]	Brazil	Frequency, microbial interactions, and antimicrobial susceptibility of <i>Fusobacterium nucleatum</i> and <i>Fusobacterium necrophorum</i> isolated from primary endodontic infections.	Root canal	(2)
Sun et al. (2009) [39]	Norway	Occurrence, population structure, and antimicrobial resistance of <i>Enterococci</i> in marginal and apical periodontitis.	Root canal	(2)
Al-Selivany et al. (2010) [40]	Iraq	Dental infections: clinical and microbiological evaluation of responsiveness to twice daily amoxicillin-clavulanic acid (amoxiclave).	Tissue swelling	(1)
Poeschl et al. (2010) [41]	Austria	Antibiotic susceptibility and resistance of the odontogenic microbiological spectrum and its clinical impact on severe deep space head and neck infections	Tissue swelling	(1)
Jungermann et al. (2011) [42]	USA	Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections.	Root canal	(2)
Sousa et al. (2013) [43]	Brazil	Microbiological profile and antimicrobial susceptibility pattern of infected root canals associated with periapical abscesses.	Root canal	(2)

(1) Studies that did not specify the cause of odontogenic abscess or odontogenic infections (if endodontic or not) or that did not specify the microbial susceptibility results for each source of infection; (2) Studies that did not specify whether the endodontic infection is acute or chronic; (3) Studies that did not report the method used to evaluate the antimicrobial resistance or used another methods other than E-test or disc diffusion.

Table A. 2. Aims and characteristics of the samples in the included studies.

Author/Year	Aims	Participants	Antibiotic exposure as exclusion criteria	Sample Size*
Khemaleelakul et al. (2002) [22]	To determine the bacterial composition of the microbiota from acute endodontic abscesses/celulites. To determine the antimicrobial susceptibility of bacteria using the E-test.	17 patients (6-45 yrs-old)	No	118 bacterial strains
Jacinto et al. (2003) [23]	To investigate the correlation between the composition of the bacterial flora isolated from infected root canals of teeth with apical periodontitis with the presence of clinical signs and symptoms. To test the antibiotic susceptibility of five anaerobic bacteria most commonly found in the root canals of symptomatic teeth.	48 patients (13-63 yrs-old)	No	66 bacterial strains
Kuriyama et al. (2005) [18]	To determine if the treatment of dentoalveolar infection was influenced by the choice of the antibiotic and the presence of penicillin-resistant bacteria. To determine any correlation between the presence of antibiotic-resistance within the infection and a history of previous antibiotic therapy.	112 patients (17-81 yrs-old)	No	410 bacterial strains
Ozbek et al. (2006) [21]	To identify microorganisms in root canals with periapical abscesses and their antimicrobial susceptibility profiles and to revise antimicrobial treatment protocols.	30 patients 14 males (31.8 yrs-old) 16 females (33.8 yrs-old)	Yes (3 months)	156 bacterial strains
Skucaite et al. (2010) [10]	To evaluate susceptibilities of endodontic pathogens isolated from teeth with symptomatic apical periodontitis to the most commonly prescribed antibiotics.	58 patients (20-73 yrs-old)	No	66 bacterial strains
Poeschl et al. (2011) [19]	To evaluate the actual bacterial resistance rates against the most commonly used antibiotics and to assess the clinical impact of the findings.	89 patients (8-85 yrs-old)	No	122 bacterial strains
Montagner et al. (2014) [20]	To detect the <i>cfxA/cfxA2</i> gene through molecular methods and to observe its expression through the MIC and degradation of a lactamase substrate.	20 patients (does not mention the average age)	Yes (3 months)	29 bacterial strains

*Number of strains that were tested for antimicrobial susceptibility.

Table A. 3. Other information of the included studies.

Author/Year	Microbial Source/Sampling	Method to measure the outcome	Antimicrobial agent
Khemaleelakul et al. (2002) [22]	Tissue swelling/Aspiration	E-test ®	Penicillin; Amoxicillin; Amoxicillin + clavulanic acid; Clindamycin; Metronidazole.
Jacinto et al. (2003) [23]	Root canal/Paper points	E-test ®	Penicillin; Amoxicillin; Amoxicillin + clavulanic acid; Clindamycin; Metronidazole; Erythromycin; Cephacolor; Azythromycin.
Kuriyama et al. (2005) [18]	Root canal/Swab Tissue swelling/Aspiration	Disk Diffusion	Penicillin; Clindamycin; Metronidazole; Erythromycin; Tetracycline.
Ozbek et al. (2006) [21]	Root canal/Paper points	Oxoid Discs® and E-test ®	Penicillin; Amoxicillin + clavulanic acid; Clindamycin; Erythromycin; Tetracycline; Cefazolin; Imipenem; Metronidazole; Cefoxitin; Piperacillin-tazobactam.
Skucaite et al. (2010) [10]	Root canal/Paper points Tissue swelling/Aspiration	E-test ®	Penicillin; Amoxicillin; Amoxicillin + clavulanic acid; Clindamycin; Metronidazole; Erythromycin; Tetracycline; Ampicillin; Vancomycin.
Poeschl et al. (2011) [19]	Tissue swelling/Swabbing or aspiration	Disk Diffusion	Penicillin; Amoxicillin; Amoxicillin + clavulanic acid; Clindamycin; Erythromycin.
Montagner et al. (2014) [20]	Root canal/Paper points	E-test®, Nitrocefin Test	Penicillin; Amoxicillin; Amoxicillin + clavulanic acid.

Table A. 4. Genus of the Tested Bacteria that were reported in each Included Study.

Author/Year	Bacteria (Genus)
Khemaleelakul et al., (2002) [22]	<i>Bacteroides</i> spp.; <i>Clostridium</i> spp.; <i>Eubacterium</i> spp.; <i>Fusobacterium</i> spp.; <i>Peptostreptococcus</i> spp.; <i>Porphyromonas</i> spp.; <i>Prevotella</i> spp.; <i>Veillonella</i> spp.; <i>Propionibacterium</i> spp.; <i>Actinomyces</i> spp.; <i>Gemella</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Corynebacterium</i> spp.; <i>Eikenella</i> spp.; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Staphylococcus</i> spp.;
Jacinto et al., (2003) [23]	<i>Fusobacterium</i> spp.; <i>Peptostreptococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Prevotella</i> spp.; <i>Gemella</i> spp.; <i>Actinomyces</i> spp.; <i>Veillonella</i> spp.; <i>Clostridium</i> spp.; <i>Propionibacterium</i> spp.; <i>Eggerthella</i> spp.; <i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Eubacterium</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Campylobacter</i> spp.; <i>Bifidobacterium</i> spp.; <i>Bacteroides</i> spp.; <i>Tissierella</i> spp.; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Porphyromonas</i> spp.
Kuriyama et al., (2005) [18]	<i>Prevotella</i> spp.; <i>Peptostreptococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Fusobacterium</i> spp.; <i>Eubacterium</i> spp.; <i>Actinomyces</i> spp.; <i>Eikenella</i> spp.; <i>Veillonella</i> spp.; <i>Propionibacterium</i> spp.; <i>Porphyromonas</i> spp.; <i>Capnocytophaga</i> spp.; <i>Clostridium</i> spp.; Unspecified- Strictly Anaerobic; Gram-Negative Bacillus; Unidentified CO ₂ Dependant; Gram-Positive Coccus.
Ozbek et al., (2006) [21]	<i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Streptococcus</i> spp.; <i>Corynebacterium</i> spp.; <i>Neisseria</i> spp.; <i>Acinetobacter</i> spp.; <i>Escherichia</i> spp.; <i>Pseudomonas</i> spp.; <i>Enterobacter</i> spp.; <i>Klebsiella</i> spp.; <i>Peptostreptococcus</i> spp.; <i>Actinomyces</i> spp.; <i>Eubacterium</i> spp.; <i>Mobilincus</i> spp.; <i>Erysipelothriks</i> spp.; <i>Fusobacterium</i> spp.; <i>Prevotella</i> spp.; <i>Bacteroides</i> spp.; <i>Porphyromonas</i> spp.
Skucaite et al., (2010) [10]	<i>Streptococcus</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Prevotella</i> spp.; <i>Bacteroides</i> spp.; <i>Anaerococcus</i> spp.; <i>Peptostreptococcus</i> spp.; <i>Tissierella</i> spp.; <i>Eikenella</i> spp.
Poeschl et al., (2011) [19]	<i>Streptococcus</i> spp.; <i>Staphylococcus</i> spp.; <i>Prevotella</i> spp.; <i>Peptostreptococcus</i> spp.; <i>Bacteroides</i> spp.; <i>Fusobacterium</i> spp.; <i>Eikenella</i> spp.; <i>Lactobacillus</i> spp.; <i>Corynebacterium</i> spp.; <i>Enterococcus</i> spp.; <i>Enterobacteriaceae</i> spp.
Montagner et al., (2014) [20]	<i>Prevotella</i> spp.; <i>Porphyromonas</i> spp.; <i>Parvimonas</i> spp.

Table A. 5. Number of resistant strains for each antibiotic in the included studies.

Author/Year	N. of bacterial strains	Resistant strains														
		PG	PV	AC	XL	CM	MZ	EM	TC	CZ	CP	AMP	VAN	IP	CX	PT
Khemaleelakul et al. (2002) [22]	118	-	23	18	0	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	58	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jacinto et al. (2003) [23]	66	7	-	0	0	3	3	7	-	-	0	-	-	-	-	-
Kuriyama et al. (2005) [18]	410	-	53	-	-	13	82	96	36	-	-	-	-	-	-	-
Ozbek et al. (2006)* [21]	156	74	-	-	-	57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	76	-	-	-	17	-	15	39	63	23	-	-	-	-	-	-
	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	14	7
Skucaite et al. (2010) [10]	66	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	21	0	-	-	-
	65	1	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	62	-	-	-	-	-	-	15	21	-	-	-	-	-	-	-
	53	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	43	-	-	-	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Poeschl et al. (2011) [19]	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	122	-	-	11	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	113	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	107	-	-	-	-	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Montagner et al. (2014)* [20]	76	-	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	-	-	-
	29	4	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* Original studies that reported the prior use of antibiotics as an exclusion criterion.

PG – penicillin G; PV – penicillin V; AC – amoxicillin; XL – amoxicillin + clavulanic acid; CM – clindamycin; MZ – metronidazole; EM – erythromycin; TC – tetracycline;

CZ – cefazolin; CP - cephaclor; AMP - ampicillin; VAN – vancomycin; IP – imipenem; CX – ceftioxin; PT – piperacillin-tazobactam.

(-) – not tested.

Table A. 6. Percentage of resistance strains, as determined by data extracted from the included studies.

Antibiotics	Overall Data			Studies that reported use of ATB Subgroup A			Studies that did not report/use the use of ATB Subgroup B		
	% _{RES}	Conf. Int.	n _{RES} /n	% _{RES}	Conf. Int.	n _{RES} /n	% _{RES}	Conf. Int.	n _{RES} /n
Amoxicillin + Clavulanic Acid	3.5	0.8-14.2	21/421	14.8%	4.6-38.6	19/105	1.4%	0.5-3.9	2/316
Amoxicillin	7.7%	3.6-15.5	31/388	6.9%	1.7-23.8	2/29	7.4%	3.0-17.2	29/359
Penicillin G	12.3%	3.6-34.6	100/458	29.1%	7.0-68.9	78/185	7.9%	4.0-15.0	18/357
Clindamycin	13.1%	5.6-27.5	123/919	36.5%	29.4-44.4	57/156	10.2%	4.4-21.8	66/756
Penicillin V	15.5%	10.2-22.8	76/528	-	-	-	15.5%	10.2-22.8	76/528
Metronidazole	17.5%	10.5-27.9	112/619	19.7%	12.3-30.2	15/76	17.0%	7.7-33.3	97/543
Erythromycin	26.0%	16.2-38.9	174/681	51.3%	40.2-62.3	39/76	21.7%	16.2-28.3	135/605
Tetracycline	40.0%	6.2-87.0	120/539	82.9%	72.7-89.8	63/76	19.9%	3.6-61.9	57/463

* %_{RES} = percentage of resistant strains (pooled values); Conf. Int. = confidence interval; n_{RES}/n = number of resistant strains/total number of strains. Subgroup A: studies that excluded patients with previous use of antibiotics [20,21]; Subgroup B: studies that did not report or did not exclude patients with previous use of antibiotics [10,18,19,22,23].

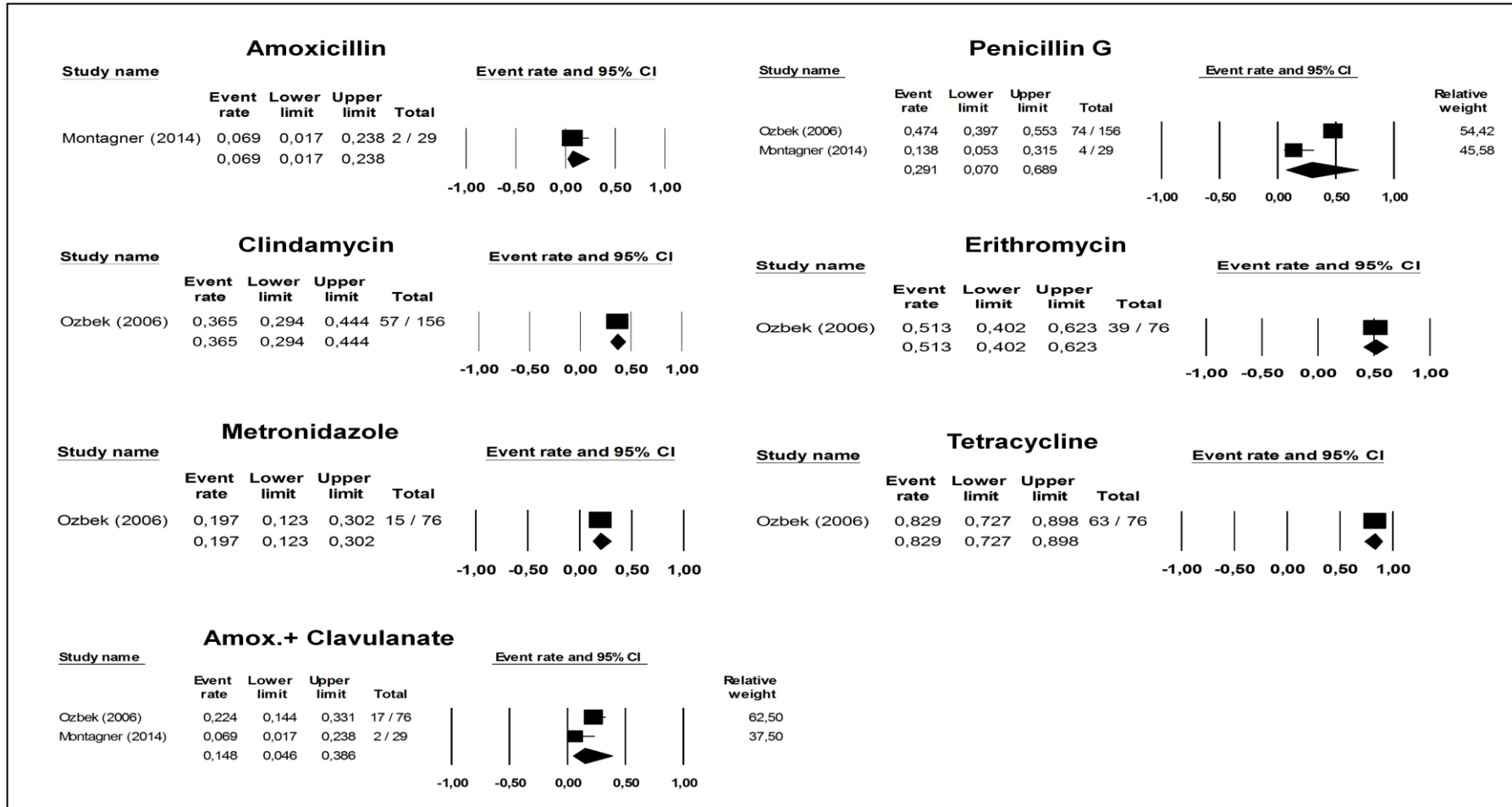


Figure C. 1. Forest plot for the antimicrobial resistance profile of clinical isolates from primary acute endodontic infections for each antimicrobial agent, according data from the studies that reported exclusion of use of antibiotics. Penicillin G (Q-value=9.479; P=0.002); Amoxicillin + clavulanate (Q-value=3.011; P=0.083).

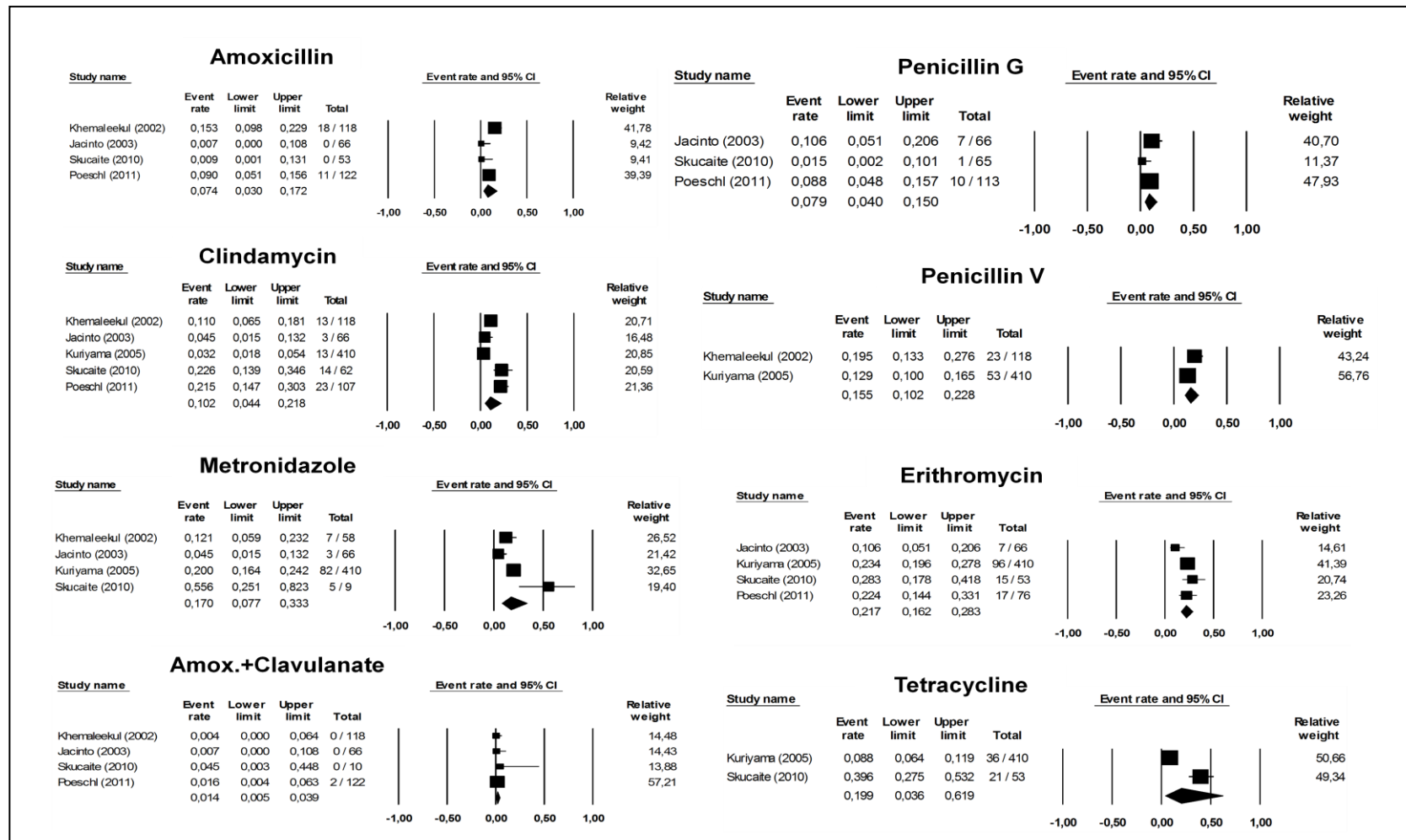


Figure C. 2 Forest plot for the antimicrobial resistance profile of clinical isolates from primary acute endodontic infections for each antimicrobial agent, according to studies that do not report the prior use of antibiotics as an exclusion criterion. Amoxicillin (Q-value=9.809; P=0.02); Penicillin G (Q-value=3.519; P=0.172); Clindamycin (Q-value=43.906; P=0.000); Penicillin V (Q-value=3.161; P=0.075); Metronidazole (Q-value=15.536; P=0.001); Erythromycin (Q-value=6.204; P=0.102); Amoxicillin + clavulanate (Q-value=1.683; P=0.641); Tetracycline (Q-value=33.7; P=0.000)

4. DISCUSSION

For the present study, a comprehensive systematic review was conducted in order to identify, to evaluate, and to synthesize all of the clinical studies that met the specified eligibility criteria in order to determine: “What are the resistance rates to antimicrobial agents in studies that isolated bacteria from patients with primary acute endodontic infections?” Although the majority of clinical isolates have been found to be susceptible to the antimicrobial agents that are usually prescribed, there was a wide range of antibiotic resistance among them. The resistance rates varied according to the previous use of an antimicrobial agent.

The currently employed methods in order to determine the susceptibility profiles of clinical isolates are regulated by standard protocols that employ a cultivation-based approach [17,42]. Only the articles that employed the disc diffusion and E-test methods were selected, because they included patterns for comparison, according to the NCLSI and EUCAST guidelines. The continuous monitoring of microbial susceptibility over time should be encouraged, but there are few reports in the current literature that describe the shift on microbial resistance to bacteria from endodontic infections [14]. There is a need for constantly revising the literature in order to obtain proper data that may guide and support the clinical choices of adjunctive systematic antimicrobial therapy. The use of statistical methods, as performed in the meta-analysis, may provide a quantitative synthesis of the data regarding the susceptibility rates of clinical isolates from patients with primary acute endodontic infections. Despite the strict selection criteria, the evaluation of the studies showed few factors that connected them. For example, several species were isolated and tested for their antimicrobial susceptibility in the articles. Furthermore, the included articles did not employ the same set of antimicrobial agents to test for the susceptibility of all of the isolates. The low number of shared information by the studies did not allow for the determination through a meta-analysis of the resistance profiles for each species/genera. The overall resistance percentages for a specific antimicrobial agent were calculated for each study, despite the species that were tested.

For primary acute endodontic infections, the overall resistance rates varied according to the antimicrobial agent. The bacterial strains were highly susceptible to amoxicillin + clavulanic acid and amoxicillin. Higher resistance rates were observed

for tetracycline. Intermediate values were observed for penicillin G, clindamycin, penicillin V, metronidazole and erythromycin, respectively. The results were in accordance with the clinical recommendations that suggest that antibiotics of the beta-lactamic group, especially amoxicillin and amoxicillin + clavulanic acid, as being the first choice for the management of acute endodontic infections, due to their efficacy, their safety, and their convenience for administration and access [5,43,44]. The low susceptibility rates for tetracycline were probably associated with the intrinsic resistance among the anaerobic strains and the secondary resistance was due to its broad use and misuse by patients [45,46]. For the past two decades, the most commonly used antibiotics in periodontal treatment has been the use of the tetracyclines [47,48]. The widespread emergence of tetracycline resistance in medically important bacteria has limited their use in the treatment of medical infections [49]. In the oral cavity, tetracycline resistance has increased over the last several years [50]. Some investigators have reported that this may be one of the reasons for the reduced effects of tetracyclines as being an adjuvant measure for the treatment of periodontitis [51-54].

Despite the differences of the laboratorial susceptibility patterns that were observed for the antimicrobial agents, it was not possible to determine whether they can influence the clinical responses to the treatment. It should be emphasized that acute endodontic infections are polymicrobial with a very high inter-individual variability. The involvement of the species in a mixed consortium promotes a broad spectrum of relationships among them, modulating their pathogenicity to additive or synergistic pathogenic effects [2,4]. The control of the endodontic infections does not have species as a main target. The eradication of some components of the microbial community may lead to its disturbance and the remaining members may not be able to survive without cross-interactions [4]. The ecological interference that is promoted by the local approach (a root canal treatment and a surgical drainage) might overcome the resistance to antimicrobial agents as demonstrated by some of the community members and leads to the resistant strain's death. However, Flynn et al., [55] reported in a prospective study that penicillin treatment failure was not predicted by pre-admission, timing, anatomic or preoperative clinical variables, in a sample of 37 subjects admitted for severe odontogenic infections. The authors observed that six out of twenty-four subjects had a penicillin treatment failure, and penicillin resistant bacterium was detected in all of the patients who had no response to the

antimicrobial treatment. Therefore, further studies with large sample sizes should be conducted in order to determine the relationships between the presence of resistant strains and the outcomes of the proposed treatment.

The previous use of antimicrobial agents is a variable that must be considered in the data analysis. Skucaite et al., [12] evaluated the susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis that had had a previous use of an antimicrobial agent. According to the results, no correlation was found between the microbial susceptibility to antibiotics and a previous antibiotic intake. However, Kuriyama et al., [18] showed that penicillin-resistant bacteria were isolated significantly more frequently from patients that had penicillin before the sampling. There was no significant correlation between the prevalence of erythromycin-resistant bacteria and a previous administration of erythromycin. Therefore, a subgroup analysis was performed concerning the results in order to determine the effects of a previous use of antibiotics. It was observed that the resistance rates were different when comparing the studies that reported a previous use of antimicrobial agents as an exclusion criterion (Subgroup A). The articles that did not report the previous use of antimicrobial agents as an exclusion criterion were in Subgroup B. These differences could be related to diverse factors: a small number of studies that had bacterial strains tested in each one; the fact that the resistance rates were obtained from a pool of bacteria; the fact that the correlation between the prevalence of resistance bacteria and a previous use of antibiotics seemed to occur for some agents, but not for others [14]. Additionally, there was a limitation of memory bias, since the patients could not remember exactly what drugs that they had used in the past 3 months. These results emphasize the need to analyze the data that was reported in the articles and consider the previous use or not of antibiotics, since the resistance rates differed between the subgroups. However, independently of the differences among the subgroups of A and B and the overall data, the general profiles of resistance remained the same: lower rates of resistance for amoxicillin and amoxicillin and clavulanic acid; higher rates of resistance for the tetracyclines; and intermediate rates with the other antimicrobial agents that were tested.

Parallely, a heterogeneity analysis was performed for specific antimicrobial agents, depending on the subgroup of the studies. There was heterogeneity among the resistance profiles for penicillin G for the studies that excluded a previous use

antimicrobial agent (Subgroup A) and for amoxicillin, clindamycin, metronidazole and tetracycline among the studies that did not reported this use (Subgroup B). These findings can be associated with the several bacterial species that were tested and for the different sites of sampling. Despite being concomitant infections, matched samples taken from the root canal and the abscess aspirates from the same subject had discrepancies between the bacterial community profiles [5]. Furthermore, the microbial profiles of the acute endodontic infection samples were unique for each subject and did not show any clustering behavior from the samples that were collected among patients [5,56]. Despite the assessment of a specific group of endodontic infections, the microbiome was modulated by its geographic location [57-59]. It was not possible to perform a region-based analysis because the samples were collected from six different countries (Thailand, Brazil, United Kingdom, Turkey, Lithuania, and Austria). Only the results reported by Jacinto et al., [23] and Montagner et al., [20] belonged to the same geographic location: Brazil.

Sensitivity analyses were performed in order to evaluate the level of confidence results, excluding those studies with the largest sample sizes [18,19], in order to evaluate if the findings were not dependent on arbitrary or unclear decisions. The overall resistance rates to erythromycin, amoxicillin + clavulanic acid and penicillin G were similar when the studies were included in the meta-analysis. However, the overall resistance rates to metronidazole, clindamycin, tetracycline and amoxicillin were different when these studies were included in the meta-analysis. Although different, it was not possible to determine whether the difference influenced the clinical response to the treatment, as discussed previously.

The results of this systematic review and meta-analysis were limited by several factors, as previously discussed. They were also associated with the limitations that were imposed by the bacterial recovery from the complex microbial communities. It should be emphasized that available cultivation methods have not yet been able to allow for the laboratorial growth and the isolation of several microorganisms. Furthermore, the results obtained through susceptibility testing represented a single microorganism or a select group of microorganisms that were isolated from the infected site. The virulence of the strains might have been modulated by their isolation in the culture media, especially due to the lack of interaction among the several microorganisms that were also present in the odontogenic infection. There was also a lack of data on the specific number of strains

that were tested for each sample in the articles. The tested isolates may have represented or not, all of the microbial community that was active in the infected site. As culturing and testing slow-growing oral bacteria can take up-to 2 weeks, the therapeutic decisions still have to be based on previous reports from the literature, as have been summarized in the present study.

4.1 Conclusion

The systematic review and the meta-analysis allowed for depicting the resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria that was isolated from acute endodontic infections. Amoxicillin + clavulanic acid and amoxicillin showed the lowest *in vitro* rates for bacterial resistance among the strains. The resistance rates for the antimicrobial agents varied according to the previous use of an antimicrobial agent. There was a lack of information regarding the association between the resistance profiles of the bacterial isolates and the clinical outcomes.

5. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors deny any conflicts of interest. We affirm that we have no financial affiliation (e.g., employment, direct payment, stock holdings, retainers, consultantships, patent licensing arrangements or honoraria), or involvement with any commercial organization with direct financial interest in the subject or materials discussed in this manuscript, nor have any such arrangements existed in the past three years. Any other potential conflict of interest is disclosed.

REFERENCES

- [1] Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic Susceptibility of Bacteria Associated with Endodontic Abscesses. *J Endod* 2002; 29:44-7.
- [2] Siqueira JF Jr, Rôças IN. Apical Abscesses Microbiology and Treatment of Acute. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26:255-73.
- [3] Gomes BPF, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:71-6.

- [4] Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res* 2009; 88:61–65.
- [5] Montagner F, Gomes BP, Kumar PS. Molecular Fingerprinting Reveals the Presence of Unique Communities Associated with Paired Samples of Root Canals and Acute Apical Abscesses. *J Endod* 2010; 36:1475-9.
- [6] Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendram D, Shah HN. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol*. 2007; 22:403-10.
- [7] Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res*. 2002; 81:761-6.
- [8] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:363-70.
- [9] Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:112-22.
- [10] Oberoi SS, Dhingra C, Sharma G, Sardana D. Antibiotics in dental practice: how justified are we. *Int Dent J* 2015; 65:4-10.
- [11] Holmes CJ, Pellecchia R. Antimicrobial therapy in management of odontogenic infections in general dentistry. *Dent Clin N Am* 2016; 60:497-507.
- [12] Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V. Susceptibility of Endodontic Pathogens to Antibiotics in Patients with Symptomatic Apical Periodontitis. *J Endod* 2010; 36:1611-6.
- [13] Cantas L, Shah SQ, Cavaco LM, Manaia CM, Walsh F, Popowska M, Garelick H, Bürgmann H, Sørum H. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiol*. 2013; 14:4-96.
- [14] Gomes BPFA, Jacinto RC, Montagner F, Souza ELR, Ferraz CCR. Analysis of the Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria Isolated from Endodontic Infections in Brazil during a Period of Nine Years. *J Endod* 2011; 37:1058-62.
- [15] Moraes LC, Só MVR, Dal Pizzol TS, Ferreira MBC, Montagner F. Distribution of Genes Related to Antimicrobial Resistance in Different Oral Environments: A Systematic Review. *J Endod* 2015; 41:434-41.
- [16] Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, Shekelle P, Stewart LA; PRISMA-P Group. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev*. 2015;4:1.

- [17] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 6th ed. M11-A6, 2004.
- [18] Kuriyama T, Absi EG, Williams DW, Lewis MAO. An outcome audit of the treatment of acute dentoalveolar infection: impact of penicillin resistance. *British Dental J* 2005;198:759-763.
- [19] Poeschl PW, Crepaz V, Russmueller G, Seemann R, Hirschl AM, Ewers R. Endodontic Pathogens Causing Deep Neck Space Infections: Clinical Impact of Different Sampling Techniques and Antibiotic Susceptibility. *J Endod* 2011;37:1201-5.
- [20] Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Mattos VS, Grecca FS, Gomes BPFA. Beta-lactamic Resistance Profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* Species Isolated from Acute Endodontic Infections. *J Endod* 2014; 40:339-344.
- [21] Ozbek SM, Evcil MS, Ozbek A, Erdogan AS, Köseoglu M. Microbiological analysis of root canals associated with periapical abscesses (with pain and swelling) and the antimicrobial susceptibility of isolated bacteria. *The Pain Clinic* 2006;18:327-337.
- [22] Khemaleelakul, S. et al. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002; 94:746-55.
- [23] Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with peripical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:285-292.
- [24] Dryden JA, Alms TA, Brown RL. Incidence of antibiotic resistance in microorganisms isolated from root canals. *J Endod* 1975;1:116-120.
- [25] Dave G, Jhala CI. Antibiotic Sensitivity of the Isolates of Dento-Alveolar Abscesses. *J Indian Dent Assoc* 1975;47:342-7.
- [26] Epstein S, Scopp IW. Antibiotics and the Intraoral Abscess. *J Periodontol* 1977;48:236-8.
- [27] Lewis, M. A. O.; MacFarlane, T. W.; McGowan, D. A. Reliability of sensitivity testing of primary culture of acute dentoalveolar abscess. *Oral Microbiol Immunol* 1988;3:177-80.
- [28] Lewis, M. A. O.; MacFarlane, T. W.; McGowan, D. A. Antibiotic susceptibility of bacteria isolated from acute dentoalveolar abscesses. *J Antimicrobial Chemotherapy* 1989;23:69-77.
- [29] Yamamoto, K. Antimicrobial Susceptibilities of Eubacterium, Peptostreptococcus, and Bacteroides Isolated from Root Canals of Teeth with Periapical Pathosis. *J Endod* 1989;15:112-6.

- [30] Roche Y, Yoshimori RN. In-vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses. *J Antimicrobial Chemotherapy* 1997;40:353-7.
- [31] Goumas PD, Naxakis SS, Papavasiliou DA, Moschovakis ED, Tsintsos SJ, Skoutelis A. Periapical Abscesses: Causal Bacteria and Antibiotic Sensitivity. *J Chemotherapy* 1997;9:415-9.
- [32] Kuriyama T, Karasawa T, Nakagawa K, Saiki Y, Yamamoto E, Nakamura S. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;90:600-8.
- [33] Chan Y, Chan C-H. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2003;36:105-10.
- [34] Blandino, G. et al. Antimicrobial Susceptibility and β -Lactamase Production of Anaerobic and Aerobic Bacteria Isolated from Pus Specimens from Orofacial Infections. *J Chemotherapy* 2007;19:495-9.
- [35] Warnke PH, Becker ST, Springer ING, et al. Penicillin compared with other advanced broad spectrum antibiotics regarding antibacterial activity against oral pathogens isolated from odontogenic abscesses. *J Cranio-Maxillofacial Surg* 2008;36:462-7.
- [36] Jacinto RC, Montagner F, Signoretti FGC, Almeida GC, Gomes BPF. Frequency, Microbial Interactions, and Antimicrobial Susceptibility of *Fusobacterium nucleatum* and *Fusobacterium necrophorum* Isolated from Primary Endodontic Infections. *J Endod* 2008;34:1451-6.
- [37] Sun J, Song X, Kristiasen BE, et al. Occurrence, Population Structure, and Antimicrobial Resistance of Enterococci in Marginal and Apical Periodontitis. *J Clin Microbiol* 2009;47:2218-2225.
- [38] Al-Selivany B, Al-Derzi NA, Agha SY. Dental Infections: Clinical and Microbiological Evaluation of Responsiveness to Twice Daily Amoxicillin-Clavulanic Acid (Amoxiclave). *J Med J* 2010;44:305-12.
- [39] Poeschl, P. W. et al. Antibiotic susceptibility and resistance of the odontogenic microbiological spectrum and its clinical impact on severe deep space head and neck infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;110:151-6.
- [40] Jungermann GB, Burns K, Nandakumar R, Tolba M, Venezia RA, Fouad AF. Antibiotic Resistance in Primary and Persistent Endodontic Infections. *J Endod* 2011;37:1337-44.
- [41] De Sousa ELR, Gomes BPF, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR. Microbiological profile and antimicrobial susceptibility pattern of infected root canals associated with periapical abscesses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:573-80.

- [42] EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing - Version 5.0 (January 2015). Source: www.eucast.org.
- [43] Ellison SJ. The role of phenoxymethylpenicillin, amoxicillin, metronidazole and clindamycin in the management of acute dentoalveolar abscesses - a review. *Br Dent J* 2009; 206:357-62.
- [44] Poveda Roda R, Bagan JV, Sanchis Bielsa JM, Carbonell Pastor E. Antibiotic use in dental practice. A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; 12:E186-92.
- [45] Rodrigues RM, Gonçalves C, Souto R, Feres-Filho EJ, Uzeda M, Colombo AP. Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J Clin Periodontol* 2004; 31:420-7.
- [46] Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis* 2003; 36:462-7.
- [47] Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol 2000* 1996; 10:45-78.
- [48] Walker C, Karpinia K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2002; 73:1188-96.
- [49] Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5:387-99.
- [50] Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol 2000* 1996; 10:79-88.
- [51] Asikainen S, Jousimies-Somer H, Kanervo A, Saxén L. The immediate efficacy of adjunctive doxycycline in treatment of localized juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol* 1990; 35:Suppl:231S-234S.
- [52] Mombelli A, Tonetti M, Lehmann B, Lang NP. Topographic distribution of black-pigmenting anaerobes before and after periodontal treatment by local delivery of tetracycline. *J Clin Periodontol* 1996; 23:906-13.
- [53] Colombo AP, Haffajee AD, Dewhirst FE, Paster BJ, Smith CM, Cugini MA, Socransky SS. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998; 25:169-80.
- [54] Wong MY, Lu CL, Liu CM, Hou LT. Microbiological response of localized sites with recurrent periodontitis in maintenance patients treated with tetracycline fibres. *J Periodontol* 1999; 70:861-8.
- [55] Flynn TR, Shanti RM, Hayes C. Severe odontogenic infections, part 2: prospective outcomes study. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; 64:1104-13.
- [56] Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Sanches PF, Gomes BPF. Clustering Behavior in Microbial Communities from Acute Endodontic Infections. *J Endod* 2012; 38:158-62.

[57] Rôças IN, Siqueira JF Jr, Debelian GJ. Analysis of Symptomatic and Asymptomatic Primary Root Canal Infections in Adult Norwegian Patients. *J Endod* 2011; 37:1206-12.

[58] Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Peixoto RS, Rosado AS. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2007; 22:14-8.

[59] Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF Jr. Prevalence of Selected Bacterial Named Species and Uncultivated Phylotypes in Endodontic Abscesses from Two Geographic Locations. *J Endod* 2006; 32:1135-8

CAPÍTULO 2

Selected facultative anaerobes species in acute endodontic infections – identification, genotypic diversity, antimicrobial susceptibility, and virulence factors

Running title: Facultative anaerobes species in acute endodontic infections.

Keywords: antimicrobial susceptibility, periapical abscess, genotypes, virulence factors, microorganisms.

* Manuscrito a ser submetido ao *International Endodontic Journal* (Qualis A1).

ABSTRACT

Aim To identify and determine the genotypic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence factors of facultative anaerobes species isolated in cases of acute endodontic infections.

Methodology Root canal samples were collected from seven teeth. Facultative anaerobes bacteria were identified by phenotypic features and MALDI-TOF MS. Antimicrobial susceptibility of strains was determined by disk-diffusion to benzylpenicillin, erythromycin and clindamycin. Twenty four *Enterococcus faecalis* strains isolated from same patient had their susceptibility determined by minimum inhibitory concentration of benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin + clavulanate using the E-test. The genotypic diversity and the virulence factors (*ace*, *asa*, *gelE*, *efaA*, *cylA*, *esp*) of the *E. faecalis* strains were analyzed by PFGE and PCR, respectively. Phenotypic expression of gelatinase and cytolysin were tested. Biofilm production was quantified.

Results Facultative anaerobes microorganisms were isolated from three teeth. *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, and *Actinomyces viscosus* were found. *Streptococcus* spp. and *S. aureus* were susceptible to benzylpenicillin. *E. faecalis* strains (24) were susceptible to benzylpenicillin, amoxicillin and amoxicillin + clavulanate. The same chromosomal DNA fragmentation profile was revealed to *E. faecalis* strains (24) isolated. The *gelE*, *ace* and *efaA* genes were detected in 18/24 *E. faecalis* strains. Gelatinase expression and biofilm production were observed.

Conclusion *Streptococcus* spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Actinomyces viscosus* was isolated and identified in the present study. *Streptococcus* spp. *S. aureus* and *E. faecalis* were susceptible to β -lactam antibiotics. *E. faecalis* strains had same chromosomal DNA fragmentation profile, however seemed to show distinct virulence profiles.

INTRODUCTION

Primary acute endodontic infections are polymicrobial and with a predominance of strict anaerobic bacteria (Siqueira Jr 2002, Gomes *et al.* 2004, Jacinto *et al.* 2007). Nevertheless, facultative anaerobic bacteria have been frequently isolated/detected in this type of infection (Khemaleelakul *et al.* 2002, Jacinto *et al.* 2003, Kuriyama *et al.* 2005, Ozbek *et al.* 2006, Siqueira Jr & Rôças 2009, Skucaite *et al.* 2010, Poeschl *et al.* 2011, Rôças *et al.* 2011, Hsiao *et al.* 2012, Siqueira Jr & Rôças 2013). The genus *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Actinomyces* spp., *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Eikenella* spp., *Lactobacillus* spp. are the most frequent found (Khemaleelakul *et al.* 2002, Jacinto *et al.* 2003, Kuriyama *et al.* 2005, Ozbek *et al.* 2006, Siqueira Jr & Rôças 2009; Poeschl *et al.* 2011, Rôças *et al.* 2011, Hsiao *et al.* 2012, Montagner *et al.* 2012). However, little is known about the role of these microorganisms in these infections.

Enterococcus faecalis is a Gram-positive and anaerobic facultative microorganism commonly found in root canal of teeth with failed endodontic therapy (Pinheiro *et al.* 2003, Sedgley *et al.* 2006, Skucaite *et al.* 2010). However, the results of the studies in relation to their presence in primary endodontic infections have inconclusive. Gomes *et al.* (2006) compared the presence of *E. faecalis* in primary and secondary root-infected canals with periapical lesions by both culture and polymerase chain reaction (PCR) analyses. In teeth with necrotic pulps, *E. faecalis* was rarely isolated by culture methods (4%), but frequently detected by PCR (82%). Furthermore, *E. faecalis* is one of major leading cause of infections endocarditis and also a common cause of hospital-acquired bacteraemia (Fernández-Guerreiro *et al.* 2002, Pinholt *et al.* 2014; Brady *et al.* 2017). Virulence factors such as collagen-binding protein (*ace*), surface protein (*esp*), gelatinase (*gelE*), aggregation substance (*asa*), cytolysin activator (*cylA*) and antigen endocarditis (*efaA*) may contribute to the ability of *E. faecalis* to cause different infections (Penas *et al.* 2013, Barbosa-Ribeiro *et al.* 2016, Heidari *et al.* 2017). Lins *et al.* (2013) isolated 20 *E. faecalis* strains from 43 patients with asymptomatic primary endodontic infection; and detected *gelE*, *agg/asa* 373 and *esp* genes in 20, 18 and 12 isolates, respectively. Barbosa-Ribeiro *et al.* (2016) found the presence of *ace* (100%), *asa* (60%), *asa373* (15%), *efaA* (95%), *esp* (70%) e *gelE* (75%) genes in *E. faecalis* strains isolated from failure of endodontic therapy. However, there is a lack in the current literature on the presence

of *E. faecalis* in symptomatic primary endodontic infections and on the characterization of their virulence factors.

Antimicrobial resistance threatens the core of modern medicine and the sustainability of an effective, global public health response to the enduring threat from infectious diseases (World Health Organization, 2015). *E. faecalis* has intrinsic resistance to clindamycin, high-level resistance to most cephalosporins and all synthetic penicillin, and decreased susceptibility to penicillin and ampicillin (Kristich *et al.* 2014). Additionally, enterococcal resistance has emerged to vancomycin (van Harten *et al.* 2017). In endodontics, the resistance profile of clinical isolates of *E. faecalis* recovered from teeth with endodontic failure has been evaluated (Pinheiro *et al.* 2003, Pinheiro *et al.* 2004; Barbosa-Ribeiro *et al.* 2016). However, the results show different resistance profile for the same antibiotics tested.

Therefore, the aims of this study were to identified and determine antimicrobial susceptibility, by diffusion disk, of facultative anaerobes isolated in cases of acute apical abscess (AAA) (section 1); and evaluated the genotypic diversity, antimicrobial susceptibility, by E-test, and virulence factors of *E. faecalis* strains isolated of root canal of same patients with AAA (section 2).

SECTION 1

Materials and Methods

Patient Selection

The present study was approved by the Ethical Committee in Research of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Porto Alegre, RS, Brazil) CAAE 46952315.1.0000.5347 and by the Ethical Committee in Research of the Grupo Hospitalar Conceição (Porto Alegre, RS, Brazil) CAAE 46952315.1.3001.5530. A total of 2880 patients that searched for dental emergency treatment were examined between August 2014 and December 2016.

Subjects with human immunodeficiency vírus (HIV) and those who had used antibiotics in the last 3 months were excluded from study. Teeth with communication between the root canal and the oral cavity; that could not be isolated with a rubber dam; previous manipulation and poor access to the apical region (as determined by

previous radiographic examinations); and periodontal probing depths of > 4 mm were also exclusion factors (Montagner *et al.*, 2014).

Seven adult patients presenting the inclusion criteria and signs/symptoms of AAA were enrolled in this study. All the participants signed an informed consent. The diagnosis of AAA was based on the presence of spontaneous pain, negative pulp sensitivity to cold test, positive sensitivity to percussion and palpation tests, and swelling (Iqbal *et al.* 2007).

Sample Collection

SALIVA

The non-stimulated saliva was collected in a sterile plastic tube for 1 minute (Papapostolou *et al.* 2011). Codes were assigned to the sample. Saliva samples were the positive control for the growth of facultative anaerobic bacteria collected from the root canal.

ROOT CANALS

Microbial samples were obtained directly from the root canal. Before clinical procedures, local anesthesia was performed with 2% lidocaine and epinephrine (1:100,000). Thus, dental caries and restorations were removed without pulp chambers exposure; and the tooth was isolated with a rubber dam. The disinfection of operative field was performed using 30% hydrogen peroxide and 2.5% sodium hypochlorite, respectively. The action of sodium hypochlorite was inactivated with 5% sodium thiosulfate. Samples from the operative field were taken after disinfection to verify the effectiveness of asepsis. After, the pulp chambers were exposure using sterile diamond burs under manual irrigation with sterile saline (Gomes *et al.* 2006).

Samples were collected with #10 K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and by aspiration. The root canals were irrigated with saline solution. The solution was stirred with a #10 K-file and aspirated with an insulin syringe (Injex, Ourinhos, SP, Brazil). Furthermore, the aspirated volume and the active part of the file were immediately transferred to sterile plastic tube with 1 mL of reduced transport medium (RTF). Codes were assigned to the root canal samples. In multirouted teeth, the samples were collected of all root canals.

Microbial Isolation and Identification

The saliva and root canal samples were vortexed for 30 seconds and serially diluted in tubes containing brain heart infusion (BHI) broth (Himedia, Mumbai, India), respectively. A 50 μ L sample of each serial dilution as well as of the undiluted sample were plated onto Triptone Yest Cistine (TYC) medium (Lab M, Lancashire, UK). Bacterial plates were incubated at 35°C (\pm 2°C) under microaerophilic conditions for 48 h. Representative colonies of different types were placed in BHI broth + 1% glucose and incubated at 35°C (\pm 2°C) for 24 h. Then, samples were subcultured on BHI agar (KASVI, Curitiba, Paraná, Brazil) with 5% defibrinated sheep blood to obtain a pure culture; and on BHI agar for susceptibility test. The plates were incubated at 35°C (\pm 2°C) for 24 h under microaerophilic conditions.

Pure cultures were initially characterized according to Gram stain characteristic, ability to produce catalysis, coagulase test. Facultative anaerobes species were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS) according Moon *et al.* (2013).

MALDI-TOF MS ANALYSIS

MALDI-TOF MS analysis was performed with a VITEK® MS-RUO version 1.0 (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Facultative anaerobes colonies grown on BHI agar with 5% defibrinated sheep blood were recovered with a 1 μ L sterile loop and placed in a single well of a disposable, barcode labeled target slide (VITEK MS-DS). Then, each colony was covered with 1.0 μ L of a solution of alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix. After co-crystallizing the sample matrix, obtained by air drying, two spots were systematically created for each colony. The quality control was analyzed using a strain of *Escherichia coli* ATCC 8739.

Antimicrobial Susceptibility Test

DISK DIFFUSION

The antimicrobial susceptibility of facultatives anaerobics microorganisms was tested for benzylpenicillin (BP), clindamycin (CM) and erythromycin (EM) (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil).

Inocula were prepared by suspending in BHI broth to a McFarland density of 0.5 for facultative anaerobes as recommended by the Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST) guidelines. Sterile cotton swabs were

used to inoculate plates with Mueller-Hinton agar (KASVI, Curitiba, Paraná, Brazil). Disks with antibiotics were then applied separately to the center of the plate. The plates were incubated at 35°C (\pm 2°C) under microaerophilic conditions for 16 to 20 h. After growth, the zone inhibition was measured around the disk with a digital caliper (Digimess, São Paulo, SP, Brazil). The presence or absence of antimicrobial resistance was evaluated following the BrCAST guidelines (BrCAST, 2017).

Table 1. Zone diameter breakpoint reference values for facultative anaerobe species (BrCAST, 2017).

Species	Antimicrobial agents	Zone diameter breakpoint (mm)		
		S \geq	I	R<
<i>Staphylococcus spp.</i>	BP	26	-	26
	CM	22	19-21	19
	EM	21	18-20	18
<i>Enterococcus spp.</i>	BP	-	-	-
	CM	-	-	-
	EM	23	14-22	13
<i>Streptococcus spp.</i>	BP	18	12-17	12
	CM	19	-	19
	EM	IE	IE	IE
<i>Actinomyces spp.</i>	BP	IE	IE	IE
	CM	-	-	-
	EM	-	-	-

Data Analysis

Descriptive statistical analysis was performed to show the characteristics of the participant and the collected tooth. Frequency of the number of the bacteria species per root canal was determined.

MALDI-TOF MS

The identification of the genus and species was considered correct according to the following: a score of \geq 2.000 indicated species level identification, a score of 1.700 to 1.999 indicated identification to the genus level, and a score of <1.700 was interpreted as “no identification”.

DISK DIFFUSION

The strains were classified as susceptible, intermediate or resistant to BP, CM and EM, according to the BrCAST guidelines (BrCAST, 2017).

Results

Facultative microorganisms were isolated from root canal in 3 out of 7 participants. The previous presence of caries and apical radiolucency were determinant factors for the isolation of facultative anaerobic bacteria. Samples of the operation field (control negative) were negative, and saliva samples (positive control) were positive to facultative anaerobes. A total of 39 isolates were identified by MALDI-TOF MS (**Table 2**). These microorganisms were tested for their antimicrobial susceptibility. *Streptococcus anginosus* strains were susceptible to BP and CM; and showed inhibition halo to EM. *Staphylococcus aureus* was susceptible to BP and CM, but resistant to EM. *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* strains were susceptible to BP and CM, but did not show inhibition halo to EM. *Actinomyces viscosus* strains form inhibition halo to BP and CM, but did not show inhibition halo to EM. *Enterococcus faecalis* strains form inhibition halo to BP and EM, but did not have inhibition halo to CM.

Table 2. Characteristics of the patients and of the teeth collected.

Case	Age	Gender	Smoker	Hypertensive	Use of anti-inflammatory	Tooth	Caries	Restotation	Apical Radiolucency	Exudate	Bacterial number
A	33	Male	No	No	Yes	35	No	Adequate	No	Yes	-
B	57	Female	Yes	Yes	No	45	Yes	Inadequate	Yes	Yes	<i>Streptococcus anginosus</i> (n=2)
C	25	Female	No	No	Yes	36	Yes	Inadequate	Yes	Yes	<i>Staphylococcus aureus</i> (n=5) <i>Streptococcus gordonii</i> (n=1) <i>Streptococcus sanguinis</i> (n=1) <i>Streptococcus oralis</i> (n=3) <i>Actinomyces viscosus</i> (n=3)
D	36	Female	Yes	No	Yes	13	Yes	Inadequate	Yes	Yes	<i>Enterococcus faecalis</i> (n=24)
E	19	Female	No	No	No	47	No	Adequate	No	No	-
F	30	Female	No	No	Yes	25	No	Adequate	No	Yes	-
G	30	Female	No	No	No	25	No	Adequate	No	No	-

SECTION 2

Materials and Methods

A total of 24 *E. faecalis* strains were isolated from the same root canal, from the same patients (Section 1). The antimicrobial susceptibility also was determined by Epsilon meter test (E-test) method (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Furthermore, the genotypic diversity was analyzed by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE); the presence of virulence genes detected by PCR; production of gelatinase, hemolytic activity and ability to form biofilm were verified.

E-TEST

The antimicrobial susceptibility to *E. faecalis* strains was determined by its minimal inhibitory concentration (MIC) values of benzylpenicillin (BP), amoxicillin (AC), and amoxicillin + clavulanate (XL) using the E-test System (Montagner *et al.*, 2014).

E. faecalis strains were suspended in BHI broth to a McFarland density of 0.5. The Mueller-Hinton agar plates were inoculated with the bacterial suspension. After 20 min of inoculation, the E-test strip was applied separately to the center of the plate; and the plates were incubated at 35°C (\pm 2°C) under microaerophilic conditions for 16 to 20 h. Then, the ellipse of inhibition around the strip was examined. The MIC was interpreted according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2017).

PFGE

PFGE method was adapted according to the protocol describe by Pinto *et al.* (2013). Agarose plugs containing *E. faecalis* were prepared. The plugs were placed in 2 mL of lysis solution (6 Mm Tris HCl; 2 M NaCl; 100 Mm Tetrasodium EDTA; 0.5% Brij-58; 0.2% Sodium deoxycholate; 0.5% Sarcosyl) + enzymes (10 U/mL mutanolysin and 1 mg/mL lysosyme) and incubated at 35°C (\pm 2°C) overnight at moderate speed. After, the lysis solution + enzymes were removed; and the plugs were placed in ES solution (0.5 M Tetrasodium EDTA; Sodium lauryl sarcosinate) + proteinase K (10 μ L/mL) and incubated at 50°C for 1 h. This step was performed

twice. Then, the plugs were washed 4 times with TE (10 mM Tris HCl 1; 0.1 mM Disodium EDTA).

Digestion was performed with 20 U of restriction enzyme *Sma*I (Anza™ 22 *Sma*I, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) for 24 h at 35°C (\pm 2°C). The enzyme was removed and the plugs were melted at 72°C \pm 5 min. After, 40 μ L of each melted plug was loaded into the wells agarose gels (KASVI, Curitiba, Paraná, Brazil); a standard DNA fragment (Lambda Ladder PFG Marker – New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) was used to provide molecular size markers. CHEF DR II System from Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, USA) was used for performing electrophoresis; the pulse time was increased from 5 to 35 s over 20 h and 5 to 10 s over 4 h at 6 V/cm (120 V) according Saeedi *et al.* (2002). Gels were stained with ethidium bromide (Ludwig Biotecnologia, Alvorada, RS, Brazil) for 20 min and then photographed under UV illumination.

PCR ASSAY VIRULENCE GENE DETECTION

Polymerase chain reactions (PCRs) were performed for the detection of genes *ace*, *asa/asa373*, *cylA*, *efaA*, *esp* and *gelE*. The oligonucleotide set (forward and reverse) was used in according to the described previously by Barbosa-Ribeiro *et al.* (2016). A total volume of 30 μ L containing 27.8 μ L *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen®, Valencia, CA, USA), 0.6 μ L of each respective primer (Invitrogen, São Paulo, SP, Brazil) and 1 μ L DNA template. The PCR conditions were determined according Creti *et al.* (2004) for the genes *ace*, *asa/asa373*, *cylA*, *efaA* and Shankar *et al.* (1999) for the genes *esp* e *gelE*. The PCR were performed in a thermocycler (Techne - Analítica, São Paulo, SP, Brazil).

The PCR products were analyzed by gel electrophoresis in 1% agarose (Invitrogen, São Paulo, Brazil) and staining (Sybr Green, Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brazil). The GelPilot® Plus Ladder (Qiagen®, Valencia, CA, USA) was used as a marker. Positive strain of the sample itself for the gene was the positive control, and PCR reaction without DNA the negative control. The presence of positive bands visualized under ultraviolet transillumination determined the presence of the targeted genes.

PRODUCTION OF GELATINASE

The production of gelatinase was evaluated by the adapted method of Anderson *et al.* (2016). *E. faecalis* strains were subcultured on BHI broth containing 12% gelatin. The inoculum was incubated at 35°C (\pm 2°C) for 24 h. The inoculum was stored at 4°C for 24 h. The production of gelatinase was confirmed as liquefied agar.

HEMOLYTIC ACTIVITY

E. faecalis strains were subcultured on BHI agar with 5% defibrinated sheep blood. After incubation at 35°C (\pm 2°C) for 24 h, the presence or not of halo around the colonies was evaluated (Coque *et al.*, 1995).

BIOFILM FORMATION ASSAY

Biofilm formation was evaluated by the adapted method of Kafil *et al.* (2016). *E. faecalis* strains were suspended in BHI broth to 0.5 McFarland. Sterile 96 well polystyrene microtiter plates (TTP, Trasadingen, Switzerland) were filled with 180 μ L Trypticase soy broth (TSB) (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) + 5% glucose and 20 μ L of inoculum (0.5 McFarland: OD 625: 0.08 and 0.1). Three wells per isolate were incubated for 24 hours at 35°C (\pm 2°C). Wells without bacteria received 180 μ L of the TSB as negative controls. After incubation, the wells were washed three times with 150 μ L of sterile phosphate buffered saline (PBS) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) at room temperature. Then, the PBS was removed and biofilms were fixed using 150 μ L of methanol for 20 min at -20°C; the plate was inverted in a paper towel for 30 min at room temperature. Biofilms were stained with 150 μ L of crystal violet solution (2%) for 15 min at room temperature and the wells were washed in running water. The plate was inverted in a paper towel at room temperature; 150 μ L of 33% acetic acid (Synth, Diadema, SP, Brazil) was added for 30 min without shaking. Biofilm production was evaluated by optical density of the re solubilized crystal Violet using a microtiter plate reader (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, MA, USA) at 570 nm (OD 570).

Data Analysis

The MIC was determined, and each strain of *E. faecalis* was classified as susceptible, intermediate or resistant to each antibiotic. The frequency of virulence genes in strains was determined according to the present specific bands. The strains

were classified as positive or negative for gelatinase production; and as α -hemolysis, β -hemolysis and γ -hemolysis according to their hemolytic activity.

PFGE

The gel photographs were saved as JPEG files, which were imported into the program “Bionumerics”, Version 6.6 (Applied Maths, Belgium). The analysis of the fragmentation profiles of the samples was performed by visual inspection. The percentages of similarity of the fragmentation profiles were estimated using *Dice* coefficient. The cut-off point to consider the bacteria as belonging to the same clonal profile was 80% similarity. Dendrograms were generated using the UPGMA method (unweighted pair method using arithmetic averages) with optimization of 0% and tolerance of 1.5%.

BIOFILM FORMATION ASSAY

The cut-off optical density (OD) for Biofilm formation by isolates was defined as the optical density higher than $OD_{570} = 0.524$ (absorbance of biofilm produced by *E. faecalis* ATCC 29212) according Kafil *et al.* (2015).

Results

The MIC range, MIC_{50%} and MIC_{90%} values obtained by E-test method to *E. faecalis* strains and susceptibility rate are showed in **Table 3**.

Table 3. Antimicrobial susceptibility of *E. faecalis* strains isolated from the same root canal from teeth with AAA.

<i>E. faecalis</i> (n=24)				
Antibiotics	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		Range ($\mu\text{g/mL}$)	Susceptibility rate (%)
	50%	90%		
Benzyl penicillin	1.5	2.0	0.75-4	100%
Amoxicillin	0.5	1.0	0.094-1.5	100%
Amoxicillin + clavulanate	0.38	0.75	0.064-1.5	100%

Susceptibility (S), intermediate (I) and resistance (R) MIC breakpoints ($\mu\text{g mL}^{-1}$) recommended by CLSI (2017): BP (≤ 8 S, 12 I, ≥ 16 R), AC (≤ 2 S, 4 I, ≥ 8 R), and XL (≤ 4 S, 8 I, ≥ 16 R).

PFGE analysis of the *E. faecalis* strains revealed the same chromosomal DNA fragmentation profile (**Figure 1**). The presence of genes that encode gelatinase (*gelE*), collagen-binding protein (*ace*) and antigen endocarditis (*efaA*) at the same was high (**Figure 1**). Positive gelatinase activity occurred in 91,66% of *E. faecalis* strains. Only γ -hemolysis was observed in the culture media. Biofilm forming activity was observed for 75% of the *E. faecalis* strains.

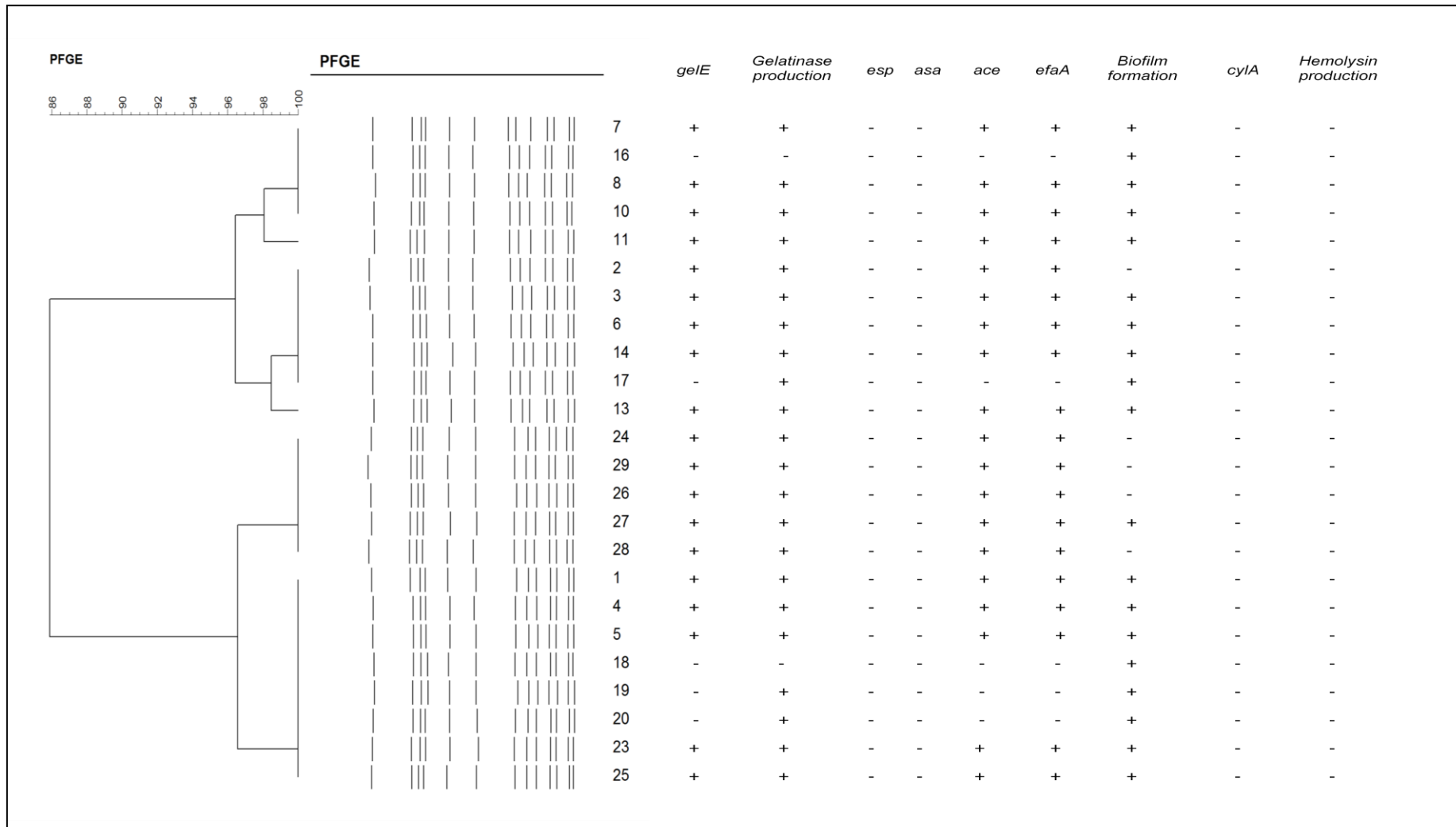


Figure 1. Genotypic diversity, presence of *geIE*, *esp*, *asa*, *ace*, *efaA* and *cyIA* genes, production of gelatinase and hemolysin and ability to form biofilm of *E. faecalis* isolated in AAA.

DISCUSSION

Although it is known that strict anaerobes comprise the great majority of the species isolated and detected in primary acute endodontic infections, there is little evidence on the presence, and phenotypic/genotypic diversities of facultative anaerobic bacteria such as estreptococci and enterococci in this group of infections. The current investigation was designed to identify and determine the genotypic diversity, antimicrobial susceptibility and virulence factors of facultative anaerobes isolated in cases of AAA.

The methods employed to microbial sampling were agitation of the root canal content with a #10 K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) followed by aspiration. According Van der Horts *et al.* (2013) sterile paper points can be a considerable source of foreign bacterial DNA. However, a limitation of the aspiration methods might be the possibility to collect also bacterial cells from the pulp chamber. In the present study, all the carious tissue was carefully removed avoid contamination between the environments.

Selective culture medium for *Streptococcus* spp. was used to microbial isolation and identification based on the phenotypic characteristics. MALDI-TOF MS was performed to identify the isolates. The advantages of MALDI-TOF MS are low time for identification, effectiveness and low cost per sample when compared to the analysis of the 16S rRNA gene (Bizzini & Greub, 2010). The PFGE was used to evaluate the genotypic diversity of *E. faecalis* strains. Previous reports in the literature indicated that PFGE is able to discriminate clones among isolates of *E. faecalis* (Murray *et al.* 1991, Tomayko & Murray 1995, Pinheiro *et al.* 2006). However, a limitation of the method is the lack of standartization to allow for comparison of results among different research centers (Pinheiro *et al.*, 2006).

Facultative anaerobic microorganisms were recoverd from 3 teeth (3/7) using the culture method. Although the culture method allows for determining the antimicrobial susceptibly of the isolates (Siqueira Jr & Rôças, 2005), it has a lower sensitivity for isolation/detection when compared to molecular methods (Gomes *et al.* 2006). Thus, microorganisms may be viable and not cultured (Signoretto *et al.* 2000). In addition, the microbial community in AAA is mixed and with a predominance of strict anaerobic bacteria (Siqueira Jr & Rôças 2009). Positive and negative bacterial association may also influence the composition of AAA (Siqueira & Rôças 2009).

Khemallelakul *et al.* (2002) showed a positive association between *Prevotella* spp. and *Streptococcus* spp. in cases of AAA. According Lewis *et al.* (1988) facultative anaerobes reduce the concentration of tissue oxygen promoting the installation of strict anaerobes. The low isolation rates for facultative anaerobes in primary acute infections might be associated to the shift of bacterial cells in biofilms associated with intraradicular endodontic infections. Both facultative and strict anaerobes have been isolated primary endodontic infections (Khemallelakul *et al.* 2002, Jacinto *et al.* 2003, Kuriyama *et al.* 2005, Ozbek *et al.* 2006, Skucaite *et al.* 2010, Poeschl *et al.* 2011). However, the high counts of strict anaerobe cells in acute endodontic infections may limit the recovery and cultivation of the less abundant cells of the facultatives. Additional studies should be conducted to characterize the microbial shift in microbial biofilms that are inside the root canal system.

In the present study, *S. anginosus*, *S. gordonii*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *E. faecalis*, *S. aureus* and *A. viscosus* were isolated, in agreement with previous reports in the literature (Khemallelakul *et al.* 2002, Jacinto *et al.* 2003, Ozbek *et al.* 2006, Poeschl *et al.* 2011). Nevertheless, different species were isolated from the different subjects. Montagner *et al.* (2010) showed that the microbial profile communities diverge between subjects in acute endodontic infections. In our study, the previous presence of caries and apical radiolucency were determinant factors for the isolation of facultative anaerobic bacteria. According Belda-Ferre *et al.* (2012) *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Actinomyces* spp. *Propionibacterium* spp. and *Veillonella* are found in sample from caries-active lesions in adults. Although less frequently, Kouidhi *et al.* (2011) have also shown the presence of *E. faecalis* in dental caries. As previously described, all the dentine with carious lesion was removed from the coronal pulp chamber to avoid cross-contamination. Molander *et al.* (1998) verified a higher number of facultative anaerobic bacteria in root-filled teeth with apical radiolucency when compared to root-filled teeth without apical radiolucency. Although in the literature, there is no association between periapical lesion and prevalence of facultative anaerobes in primary endodontic infection. This may explain the absence of cultivable bacteria in 4 cases in our study.

The inappropriate prescription by health professionals has contributed to the increase of antimicrobial resistance (Marra *et al.* 2015, Ayukekbong *et al.* 2017). In endodontics, antibiotics should be used as adjunctive treatment in the management of acute endodontic infections with systemic involvement, or in patients at risk of

secondary infection (Siqueira & Rôças 2013). β -lactamic drugs are the antibiotics of choice for the coadjuvant treatment of endodontic infections (Flynn 2011, ESE 2017). In this study, *Streptococcus* spp.; *S. aureus* and *E. faecalis* were susceptible to β -lactam antibiotics. Khemaleelakul *et al.* (2002) evaluated the antimicrobial susceptibilities of isolates from acute endodontic abscesses/cellulitis. The resistance rate of facultative anaerobes was 12.76% for AC and 21.27% for penicillin V. However, other facultative anaerobic species were tested. Kuriyama *et al.* (2005) showed that *Streptococcus* spp. and *Actinomyces* spp. were susceptible to penicillin V. Poeschl *et al.* (2011) reported resistant to penicillin G and AC in 7.52% and 6.45% of the facultative anaerobic microorganisms isolated, respectively. Alterations in penicillin binding proteins (PBPs), β -lactamase or penicillase production are the main resistance mechanisms to β -lactam antibiotics developed by facultative anaerobic bacteria (Dowson *et al.* 1989, Fontana *et al.* 1992, Smith *et al.* 1993; Smith & Klugman 1995, Nakayama & Takao 2003, Smith *et al.* 2004).

The findings of our study show that *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* were resistant to EM; and *Actinomyces viscosus* did not show inhibition halo to EM. Other studies also verified high antimicrobial resistant of *Streptococcus* spp. and *Staphylococcus aureus* to EM, with resistance values of 65% and 63.2% respectively (Ozbeck *et al.* 2006, Skucaite *et al.* 2010). Poeschl *et al.* (2011) reported a resistance range of 24% for *Streptococcus* spp. and 21% *Staphylococcus* spp. All *E. faecalis* strains did not show inhibition halo to CM. These data confirm its intrinsic resistance to the antibiotic (Kristich *et al.* 2014), although the CM is indicated as alternative for patients allergic to penicillin as an adjunctive therapy to the treatment of AAA (Flynn 2011, Segura-Egea *et al.* 2017). It should be emphasized that other microorganisms are part of the community of acute endodontic infections, and may be susceptible to clindamycin. The presence of a virulent multispecies bacterial community can be a result of all microbial interactions, favoring the occurrence an acute inflammation (Rôças *et al.* 2011).

In our study, 24 *E. faecalis* strains were isolated in a single root canal. The same chromosomal DNA fragmentation profile was revealed using PFGE method with a similarity rate of 80%. Therefore, we conclude that strains isolated from the same root canal can be considered as clones. Although the genotypic profile of the *E. faecalis* strains seemed to be identical, there was the presence of different

virulence factors among strains. Eaton & Gasson (2001) reported that most virulence genes are associated with highly transmissible plasmids and do not belong to the chromosomal DNA. Therefore, a single clonal group of strains may acquire different virulence genes by conjugation. It suggested that different clones from the same strain may interact with different species and obtain several virulence determinants, depending on the unique environmental conditions that are present inside the same root canal space. It suggested that different clones from the same strain may interact with different species and obtain several virulence determinants, depending on the unique environmental conditions that are present inside the same root canal space.

In this study, there was a high prevalence rate for the detection of *ace*, *efaA* and *geE* genes among the isolates. The collagen binding protein (*ace* gene) is related to the establishment of *E. faecalis* in infected dentin (Nallapareddy *et al.*, 2000). Moreover, *ace* gene is a *housekeeping* gene (Nallapareddy *et al.*, 2002). Barbosa-Ribeiro *et al.* (2016) detected the presence of *ace* gene in 100% of *E. faecalis* strains isolates from teeth with failure of the endodontic treatment. However, this gene was found in 75% of *E. faecalis* strains isolates in this study. It may occur due to non-amplification of the gene, suggesting DNA degradation or punctual mutation in the sequencing, not allowing for primer annealing and the nucleic acid extension.

The *geE* gene was detected in 18/24 *E. faecalis* isolates. Barbosa-Ribeiro *et al.* (2016) detected the *geE* gene in 75% of *E. faecalis* strains isolated from teeth with failure of the endodontic treatment. Lins *et al.* (2013) verified the presence of *geE* genes in 100% of *E. faecalis* strains isolated from primary endodontic infections. These results suggest that the presence of the *geE* gene is frequent in *E. faecalis* strains isolates from endodontic infection. The literature shows positive correlation between the presence of *geE* and gelatinase production (Biviasco *et al.* 2007, Anderson *et al.* 2016). Gelatinase production was verified in 22/24 *E. faecalis* strains. However, the *geE* gene was not verified in 3 strains positive to gelatinase. Further studies should be conducted to determine if additional virulence factors may contribute to gelatinase production. According Mäkinen *et al.* (1989), the gelatinase may dissolve collagen protein or tissue protein from host cells. Steck *et al.* (2011) reported in animal study that *E. faecalis* metalloprotease (gelatinase) compromises epithelial barrier (E-cadherin) and contributes to intestinal inflammation. In

endodontics the presence of gelatinase has been related to periapical alveolar bone loss (Wang *et al.* 2011).

The *efaA* gene was detected in 75% of *E. faecalis* strains isolates from AAA. Barbosa-Ribeiro *et al.* (2016) also found high prevalence of *efaA* gene *E. faecalis* isolates from secondary/persistent endodontic infection. The great majority of the *E. faecalis* strains isolates in the present study were biofilm producers. Anderson *et al.* (2016) reported that different *E. faecalis* strains differ in their ability to form biofilm. The biofilm OD₅₇₀ as detected by biofilm assay on polystyrene plates and adherence to polyvinyl chloride (PVC) plastic might be influenced by some factors, such as the glucose concentration in the culture media. Toledo-Arana *et al.* (2001) used TSB with 0.25% glucose and Kafil *et al.* (2016) used TBS with 0.5%.

The *esp* gene has also been associated with biofilm production (Toledo-Arana *et al.* 2001). High prevalence of the *esp* gene has been found in *E. faecalis* spp. isolated from primary and secondary/persistent endodontic infection (Lins *et al.* 2013, Penas *et al.* 2013, Barbosa-Ribeiro *et al.* 2016). Nevertheless, the presence this gene was not detected in *E. faecalis* strains isolates in this study despite the biofilm production. Anderson *et al.* (2016) evaluated the association between the virulence factors and the ability to produce biofilm in *E. faecalis* isolates from food, clinical specimens and oral sites; the *esp*-negative isolates were moderate or high biofilm producers. However, current literature shows that several genes and virulence factors might be determinants to biofilm production by *Enterococcus* spp (Kreft *et al.*, 1992, Kafil *et al.*, 2015, Anderson *et al.*, 2016). Therefore, association between a single gene and biofilm production might not be adequate.

E. faecalis strains analyzed in this study had no haemolytic activity. The *cyIA* gene was not detected in the strains. Barbosa-Ribeiro *et al.* (2016) also did not found the *cyIA* gene in *E. faecalis* isolates from root canals in teeth with secondary/persistent root canal infections. Previous studies from the literature did not detected *cyIB* gene in *E. faecalis* isolates from endodontic infections (Lins *et al.* 2013, Penas *et al.* 2013). Our findings agree with the statement by Penas *et al.* (2013) that reported the little or not relevant effect of citolisin for the pathogenicity of *E. faecalis* isolates from root canal infection.

The *asa* gene was not found in *E. faecalis* isolates from AAA. However, Barbosa-Ribeiro detected *asa* gene in 60% of the *E. faecalis* isolates from secondary/persistent endodontic infection. The *asa* gene encodes the aggregation

substance. This substance increases the adherence and invasion of *E. faecalis* within human macrophages (Süssmuth *et al.* 2000). It should be emphasized that *E. faecalis* isolated from primary or secondary/persistent endodontic infections may have different pathogenic characteristics.

CONCLUSION

Streptococcus spp., *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Actinomyces viscosus* were isolated and identified in the present study from root canals associated with acute primary endodontic infections. There is variability in the composition of the microbial community between different subjects. Facultative species were isolated from root canals in teeth with caries and apical radiolucency. The *Streptococcus* spp. *S. aureus* and *E. faecalis* were susceptible to the β -lactamic antibiotics. Despite the presence of a single clone of *E. faecalis* inside the same root canal, the isolates harboured different virulence factors.

Conflict of Interest statement

There are no conflicts of interest in connection with this article.

REFERENCES

- Anderson AC, Jonas D, Huber I *et al.* (2016) *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. *Frontiers in Microbiology* **6**, 1-14.
- Ayukekbong JÁ, Ntemgwa M, Atabe AN (2017) The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* doi:10.1186/s13756-017-0208-x. [Epub ahead of print]
- Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA (2016) Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic failure. *Journal of Endodontics* **42**, 1022-8.
- Belda-Ferre P, Alcaraz LD, Cabrera-Rubio R *et al.* (2012) The oral metagenoma in health and disease. *The International Society for Microbial Ecology Journal* **6**, 46-56.
- Biviasco F, Foglia G, Paoletti C *et al.* (2007) *VanA-Type* Enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, *Tn1546* typing and locations, and virulence determinants. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3307-19.

Bizzini A, Greub G (2010) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. *Clinical Microbiology and Infection* **16**, 1614-9.

Brady M, Oza A, Cunney R, Burns K (2017) Attributable mortality of hospital-acquired bloodstream infections in Ireland. *Journal of Hospital Infection* **96**, 35-41.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. [WWW document]. URL <https://clsi.org>. [accessed on 1 September 2017].

Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE (1995) Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and community-based persons. *The Journal of Infectious Diseases* **171**, 1223-9.

Dowson CG, Hutchison A, Spratt BG (1989) Extensive remodeling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **3**, 95-102.

Eaton TJ, Gasson MJ (2001) Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1628-35.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2017). Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [WWW document]. URL <http://brcast.org.br> [accessed on 1 September 2017].

Fernández-Guerrero ML, Herrero L, Bellver M, Gadea I, Roblas RF, De Górgolas M (2002) Nosocomial enterococcal endocarditis: a serious hazard for hospitalized patients with enterococcal bacteraemia. *Journal of Internal Medicine* **252**, 510-5.

Flynn TR (2011) What are the antibiotics choice for odontogenic infections, and how long should the treatment course last? *Oral Maxillofacial Surgical Clinical North American* **23**, 519-36.

Fontana R, Amalfitano G, Rossi L, Satta G (1992) Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci. *Clinical Infectious Diseases* **15**, 486-9.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR et al. (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 71-6.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Sousa ELR et al. (2006) *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* **102**, 247-53.

Heidari H, Hasanpour S, Ebrahim-Saraie HS, Motamedifar M (2017) High incidence of virulence factors among clinical *Enterococcus faecalis* isolated in southwestern Iran. *Infection & Chemotherapy* **49**, 51-6.

Hsiao WWL, Li KL, Liu Z, Jones C, Fraser-Liggett CM, Fouad AF (2012) Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. *BMC Genomics* **13**, 345-60.

Iqbal M, Kim S, Yoon F (2007) An investigation into differential diagnosis of pulp and periapical pain: A pennendo database study. *Journal of Endodontics* **33**, 548-51.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza Filho FJ (2003) Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiology and Immunology* **18**, 285-92.

Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendram D, Shah HN (2007) Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiology and Immunology* **22**, 403-10.

Kafil HS, Mobares AM (2015) Assessment of biofilm formation by enterococci isolates from urinary tract infections with different virulence profiles. *Journal of King Saud University - Science* **27**, 312-7.

Kafil HS, Mobarez AM, Moghadam MF, Hashemi ZS, Yousefi M (2016) Gentamicin induces *efaA* expression and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *Microbial Pathogenesis* **92**, 20-5.

Khemaleelakul S, Baumgartner C, Pruksakorn S (2002) Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* **94**, 746-55.

Kouidhi B, Zmantar T, Mahdouani K, Hentati H, Bakhrouf A (2011) Antibiotic resistance and adhesion properties of oral *Enterococci* associated to dental caries. *BioMed Central Microbiology* **11**, 1-7.

Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of *Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultures renal tubular cells (1992). *Infection and Immunity* **60**, 25-30.

Kristich CJ, Rice LB, Arias CA (2014) Enterococcal infection – treatment and antibiotic resistance. In Gilmore MS, Clewell DB, Ike Y, Shankar N, ed. *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection* [Internet]. Boston, MA, USA :Eye and Ear Infirmary.

Kuriyama T, Absi EG, Williams DW, Lewis MAO (2005) An outcome audit of the treatment of acute dentialveolar infection: impact of penicillin resistance. *British Dental Journal* **198**, 759-63.

Lewis MAO, MacFarlane TW, McGowan DA (1986) Quantitative bacteriology of acute dento-alveolar abscesses. *Journal of Medical Microbiology* **21**:101-4.

Lins RX, Andrade AO, Hirata Jr. R, Wilson MJ, Lewis MAO, Williams DW, Fidel RAS (2013) Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *Journal of Dentistry* **41**, 779-86.

Mäkinen P-L, Clewell DB, An F, Mäkinen KK (1989) Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (Strain 0G1-10). *The Journal of Biological Chemistry* **264**, 3325-34.

Marra F, George D, Chong M, Sutherland S, Patrick DM (2016) Antibiotics prescribing by dentists has increased. Why? *Journal of the American Dental Association* **147**, 320-7, 2016.

Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T (1998) Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **31**, 1-7.

Möller AJR, Fabricius L, Dahlén G, Öhman AE, Heyden G (1981) Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* **89**, 475-84.

Montagner F, Gomes BP, Kumar PS (2010) Molecular Fingerprinting Reveals the Presence of Unique Communities Associated with Paired Samples of Root Canals and Acute Apical Abscesses. *Journal of Endodontics* **36**, 1475-9.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Sanches PF, Gomes BPFA (2012) Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. *Journal of Endodontics* **38**, 158-62.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Mattos VS, Grecca FS, Gomes BPFA (2014) Beta-lactamic Resistance Profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* Species Isolated from Acute Endodontic Infections. *Journal of Endodontics* **40**, 339-344.

Moon H-W, Lee SH, Chung H-S, Lee M, Lee K (2013) Performance of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry system for identification of Gram-positive cocci routinely isolated in clinical microbiological laboratories. *Journal of Medical Microbiology* **62**, 1301-6.

Murray BE (1991) β -lactamase producing Enterococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 2355-9.

Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* **148**, 257-66.

Nakayama A, Takao A (2003) β -Lactam resistance in *Streptococcus mitis* isolated from saliva of healthy subjects. *Journal of Infection and Chemotherapy* **9**, 321-7.

- Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE (2000). Enterococcus faecalis adhesion, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV, and laminin as well as collagen type I. *Infection and Immunity* **68**, 5218-24.
- Nallapareddy SR, Duh RW, Singh KV, Murray BE (2002) Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 868-72.
- Ozbek SM, Evcil MS, Ozbek A, Erdogan AS, Köseoglu M (2006) Microbiological analysis of root canals associated with periapical abscesses (with pain and swelling) and the antimicrobial susceptibility of isolated bacteria. *The Pain Clinic* **18**, 327-37.
- Papapostolou A, Kroffke B, Tatakis DN, Nagaraja HN, Kumar PS (2011) Contribution of host genotype to the composition of health-associated supragingival and subgingival microbiomes. *Journal of Clinical Periodontology* **38**, 517-24.
- Penas PP, Mayer MP, Gomes BP et al. (2013) Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolated from root canal and systemic infections. *Journal of Endodontics* **39**, 858-64.
- Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2003) Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology* **18**, 100-3.
- Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ (2004) Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal* **37**, 756-63.
- Pinheiro ET, Anderson MJ, Gomes BP, Drucker DB (2006) Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Oral Microbiology and Immunology* **21**, 137-44.
- Pinholt M, Ostergaard C, Arpi M et al. (2014) Incidence, clinical characteristics and 30-day mortality of enterococcal bacteraemia in Denmark 2006-2009: a population-based cohort study. *Clinical Microbiology and Infection* **20**, 145-51.
- Pinto TC, Souza AR, de Pina SE et al. (2013) Phenotypic and molecular characterization of optochin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Brazil, with description of five novel mutations in the APTC gene. *Journal of Clinical Microbiology* **51**, 3242-9.
- Poeschl PW, Crepaz V, Russmueller G, Seemann R, Hirschl AM, Ewers R (2011) Endodontic pathogens causing deep neck space infections: clinical impact of different sampling techniques and antibiotic susceptibility. *Journal of Endodontics* **37**, 1201-5.
- Rôças IN, Siqueira Jr. JF, Debelian GJ (2011) Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult norwegian patients. *Journal of Endodontics* **37**, 1206-12.

Sedgley C, Nagel A, Dahlén G, Reit C, Molander A (2006) Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canal. *Journal of Endodontics* **32**, 173-7.

Segura-Egea JJ, Gould K, Şen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzone A, Sunay H, Tjäderhane L, Dummer PMH (2017) European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontics. *International Endodontic Journal* doi: 10.1111/iej.12781. [Epub ahead of print]

Shankar V (1999) Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and Immunity* **67**, 193-200.

Signoretto C, Mar Lleò M, Tafi MC, Canepari P (2000) Cell walls chemical composition of *Enterococcus faecalis* in the viable but nonculturable state. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 1953-9.

Siqueira Jr. JF (2002) Endodontic infections: Concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* **94**, 281-93.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN (2009) The microbiota of acute apical abscesses. *Journal Dental Research* **88**, 60-5.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN (2005) Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1- Current molecular Technologies for microbiological diagnosis. *Journal of Endodontics* **31**, 411-23.

Siqueira Jr. JF, Rôças IN (2013) Apical Abscesses Microbiology and Treatment of Acute. *Clinical Microbiology Reviews* **26**, 255-73.

Sjöergén U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal* **30**, 297-306.

Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ, Spratt BG (1993) Genetic Diversity of Penicillin-Binding Protein 2B e 2X Genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **37**, 1938-44.

Smith AM, Klugman KP (1995) Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **39**, 859-67.

Smith A, Jackson MS, Kennedy H (2004) Antimicrobial Susceptibility of Viridans Group Streptococcal Blood Isolates to Eight Antimicrobial Agents. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **36**, 259-63.

Skucaite N, Peciuliene V, Vitkauskiene A, Machiulskiene V (2010) Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *Journal of Endodontics* **36**, 1611-6.

Steck N, Hoffmann M, Sava IG et al. (2011) Enterococcus faecalis metalloprotease compromises epithelial barrier and contributes to intestinal inflammation. *Gastroenterology* **141**, 959-71.

Strateva T, Atanasova D, Savov E, Petrova G, Mitov I (2016) Incidence of virulence determinants in clinical *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates collected in Bulgaria. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* **20**, 127-33.

Süssmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rozdzinski E (2000) Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and intracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. *Infection and Immunity* **68**, 4900-6.

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C et al. (2001) The enterococcal surface protein, *esp*, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 4538-45.

Tomayko JF, Murray BE (1995) Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinental sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **33**, 2903-7.

Van Harten RM, Willems RJL, Martin NI, Hendrickx APA (2017) Multidrug-resistant enterococcal infections: new compounds, novel antimicrobial therapies? *Trends in Microbiology* **25**, 467-79.

Van der Horts J, Buijs MJ, Laine ML et al. (2013) Sterile paper points as a bacterial DNA-contamination source in microbiome profiles of clinical samples. *Journal of Dentistry* **41**, 1297-1301.

Wang L, Dong M, Zheng J et al. (2011) Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canal patients requiring endodontic retreatment. *Journal of Endodontics* **37**, 631-6.

World Health Organization (2015). Global action plan on antimicrobial resistance. [WWW document]. URL <http://www.who.int/en> [accessed on 1 September 2017].

CAPÍTULO 3

Orientações de uso de agentes antimicrobianos em infecções endodônticas agudas – proposta de difusão de conhecimentos para qualificar a assistência em saúde bucal

Pauline Mastella Lang – Estudante de Pós-graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Daniel Marconi – Estudante de Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

Maria Beatriz Cardoso Ferreira – Professora Titular, Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Francisco Montagner – Professor Adjunto, Área de Endodontia, Departamento de Odontologia Conservadora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

3.1 ORIENTAÇÕES AO PROFISSIONAL

As infecções endodônticas agudas primárias são infecções polimicrobianas, nas quais há o predomínio de bactérias anaeróbias estritas. A periodontite apical aguda (PAA) e o abscesso apical agudo (AAA) são manifestações típicas da infecção endodôntica aguda, sendo que a PAA precede o AAA.

O tratamento local da PAA e do AAA envolve a drenagem (via canal ou cirúrgica) quando possível e tratamento endodôntico ou até mesmo a exodontia quando ela for corretamente indicada.

Quando devemos prescrever antibióticos?

A prescrição de antibióticos é indicada como terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico somente nos casos de AAA em que os pacientes apresentam sintomatologia dolorosa associada a edema progressivo, difuso e sinais sistêmicos de infecção como febre, mal-estar e linfadenopatia; ou em pacientes que apresentam maior risco de infecção secundária resultante de bacteremia.

Qual a importância do uso racional de antibióticos?

O uso racional de antibióticos tem como objetivo evitar a ocorrência de resistência bacteriana aos antibióticos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO) houve um aumento da resistência bacteriana aos antibióticos tanto na medicina, como na odontologia nos últimos anos. Entre as possíveis razões para o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos estão prescrições inapropriadas, uso inadequado pelos pacientes, diagnósticos limitados, venda não autorizada, falta de mecanismos adequados para regulamentação de medicamentos em utilização, e uso em não humanos.

Como as bactérias tornam-se resistente aos antibióticos?

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ocorrer de forma natural (intrínseca) ou de forma adquirida. A resistência natural é aquela inerente à célula bacteriana, determinada pela dificuldade do fármaco ultrapassar as superfícies externas das células bacterianas e ligar-se ao seu sítio de ação. Já a resistência adquirida, resulta quando bactérias originalmente sensíveis tornam-se resistentes

devido a uma alteração genética determinada por mutações ou aquisição de plasmídios.

Quais antibióticos devem ser prescritos?

Os antibióticos β -lactâmicos (Penicilina V e amoxicilina) são os fármacos indicados para o tratamento coadjuvante de infecções endodônticas agudas. Isso ocorre em virtude do seu amplo espectro diante de uma infecção polimicrobiana, devido a sua baixa toxicidade para eucariontes, por apresentar um excelente perfil de segurança e baixo custo quando comparado a outros antibióticos.

Em casos de falha no tratamento com amoxicilina, recomenda-se a sua associação com ácido clavulânico. E em situações nas quais se observa alergia à penicilina, a clindamicina passa a ser o antibiótico de escolha. A Sociedade Europeia de Endodontia também recomenda em casos de alergia a penicilina, o uso de claritromicina ou azitromicina.

Tabela 1. Tipo, dosagem e duração de antibióticos prescritos em Endodontia de acordo com Segura-Egea et al. (2017).

Antibiótico de escolha	Dose inicial	Dose de manutenção	Duração
Penicilina V	1000 mg	500 mg 4/4 horas 500 mg 6/6 horas	3 a 7 dias
Amoxicilina	1000 mg	500 mg 8/8 horas 875 mg 12/12 horas	3 a 7 dias
Amoxicilina + ácido clavulânico	1000 mg	500 mg 8/8 horas 875 mg 12/12 horas	3 a 7 dias
Clindamicina	600 mg	300 mg 6/6 horas	3 a 7 dias
Claritromicina	500 mg	250 mg 12/12 horas	3 a 7 dias
Azitromicina	500 mg	250 mg 24/24 horas	3 a 7 dias

Como o cirurgião-dentista pode contribuir para o uso correto dos antibióticos sistêmicos?

O profissional pode contribuir para que não haja um aumento na resistência bacteriana aos antibióticos sistêmicos comumente prescritos utilizando as seguintes abordagens:

- Educação continuada – é de suma importância que o cirurgião-dentista mantenha-se atualizado em relação ao tema, seja por meio da leitura de artigos científicos, ou frequentando congressos que abordem o assunto.
- Diagnóstico preciso – o profissional deve ser capaz de realizar um correto diagnóstico, e lembrar que em casos de pulpite irreversível, necrose pulpar, periodontite apical aguda, abscesso crônico e abscesso apical agudo sem envolvimento sistêmico a terapia antibiótica é contraindicada.
- Prescrição baseada em evidências científicas – o cirurgião-dentista deve conhecer os principais micorganismos que compõe a infecção e prescrever somente os antibióticos indicados para aquele tipo de infecção.
- Tratamento local – o profissional deve realizar o tratamento local para o combate da infecção, e lembrar que a terapia antibiótica sistêmica é apenas coadjuvante.
- Orientação ao paciente – o cirurgião-dentista deve orientar o paciente em relação ao uso do medicamento, ou seja, alertar o paciente que a medicação deve ser utilizada nas doses e nos intervalos recomendados. Além disso, o profissional deve salientar a importância de não interromper o tratamento, a fim de evitar que bactérias mais resistentes retornem ao organismo e agravem a situação.

3.2 ORIENTAÇÕES AO PACIENTE

Antibióticos são os medicamentos empregados para combater processos infecciosos causados por bactérias, e deve ser utilizado por você somente com receita, do médico ou do dentista.

Como você deve utilizar?

Os antibióticos devem ser utilizados nas doses e nos intervalos recomendados pelo profissional que o prescreve. Por exemplo, você recebeu a seguinte prescrição de antibiótico:

Consultório Odontológico
Cirurgião Dentista
CRO

Fulano de Tal
Via Oral
Amoxicilina 500 mg – 21 comprimidos
Tomar 1 comprimido de 8 em 8 horas por 7 dias

Cirurgião-Dentista
Data

Endereço do consultório
Telefone do consultório

Figura 1. Modelo de prescrição de antibiótico.

Então, você deverá utilizar comprimidos com dose de 500 mg em intervalos de 8 horas durante 7 dias. Se você utilizar uma dose maior do que a recomendada, você pode ter uma intoxicação. Se você utilizar uma dose menor, pode haver agravamento dos sintomas da doença. O mesmo ocorre quando o medicamento é

ingerido antes do horário, ou quando você esquece. Por isso, é importante que os intervalos sejam adequados a sua rotina. Lembre-se que a figura acima é apenas um exemplo. Leia a sua receita, tire as suas dúvidas com o médico ou com o dentista, e assim, utilize o medicamento.

O que você deve fazer caso esqueça o horário?

Caso você esqueça de usar o antibiótico no horário proposto pelo profissional, ao lembrar você deve utilizá-lo. Assim, você conseguirá que o antibiótico ainda seja eficaz contra as bactérias responsáveis pela infecção.

Por que você não deve interromper o tratamento?

Porque ao interromper o tratamento você contribui para a seleção de bactérias mais fortes, as chamadas BACTÉRIAS RESISTENTES. Essas bactérias resistem à ação do antibiótico, fazendo com que este perca o seu efeito.

Como você deve proceder em caso de alergia ao medicamento?

Se você notar algum desconforto como dermatite, diarreia, náuseas durante o uso do antibiótico prescrito, você deve entrar em contato com o profissional que fez a prescrição **IMEDIATAMENTE**, para que ele substitua o antibiótico e faça as recomendações que julgar necessárias.

Por que você não deve utilizar antibióticos sem realizar consulta prévia?

Porque existem antibióticos específicos para cada tipo de infecção. Ao realizar uma consulta prévia, o profissional fará o diagnóstico, e indicará o antibiótico adequado para combater o microrganismo responsável pela doença.

REFERÊNCIAS

AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M., ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. **Antimicrob. Res. Infect. Control**, London, v. 6, no. 46, p. 1-8, 2017.

DE PAULA, K. B. et al. Patient automedication and professional prescription pattern in an urgency service in Brazil. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 28, no. 1, p. 1-6, 2014.

FLYNN, T. R. What are the antibiotics choice for odontogenic infections, and how long should the treatment course last? **Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 23, no., p. 519-36, 2011.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, Washington, v. 37, no. 10, p. 2045-53, 1993.

MARRA, F. et al. Antibiotics prescribing by dentists has increased. Why? **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 147, no.5, p. 320-7, 2016.

SEGURA-EGEA et al. European Society of Endodontology position statement: the use of antibiotics in endodontic. **Int. Endod. J.** (2017).

SILVA, P. Farmacologia. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

SIQUEIRA JR., J. F.; RÔÇAS, I. N. The microbiota of acute apical abscesses. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 88, no. 1, p. 60-5, 2009.

SIQUEIRA JR., J. F.; RÔÇAS, I. N. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 26, no. 2, p. 255-73, 2013.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Resistance: Global report on surveillance (2014).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A WHO recomenda o monitoramento da eficácia das intervenções de saúde pública e detecção de novas tendências e ameaças para elaboração de estratégias de ação global frente ao aumento da resistência bacteriana aos antibióticos (WHO, 2015). Em virtude disso, o propósito do **Capítulo 1** da tese foi realizar uma revisão sistemática e meta-análise para descrever o perfil de resistência bacteriana de cepas isoladas de infecções endodônticas primárias agudas reportado na literatura até maio de 2015. De acordo com os resultados encontrados nos estudos selecionados, os micro-organismos isolados de infecções endodônticas primárias agudas ainda são altamente sensíveis à amoxicilina associada ao ácido clavulânico e à amoxicilina. Valores intermediários de resistência foram observados para penicilina G, clindamicina, penicilina V, metronidazol e eritromicina; e altos valores de resistência foram observados para tetraciclina. Esses resultados fornecem elementos que dão suporte à prescrição da amoxicilina como antibiótico de primeira escolha no manejo das infecções endodônticas agudas, sua associação com ácido clavulânico em casos de falha da terapia, e a utilização da clindamicina para pacientes alérgicos aos antibióticos β -lactâmicos, concordando com Flynn (2011) e com recentes recomendações da Sociedade Europeia de Endodontia (SEGURAGEA, 2017). Embora a clindamicina tenha mostrado valores de resistência intermediária, devemos lembrar que a categoria intermediária inclui isolados cujas MICs são próximas à concentração sérica máxima obtida por aquele antimicrobiano. Ademais, os antibióticos sistêmicos devem ser utilizados como terapia coadjuvante ao tratamento local em endodontia (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2013). O tratamento local por meio da drenagem (via canal ou cirúrgica) reduz a carga microbiana (VIANNA et al., 2006; ENDO et al., 2012), e talvez auxilie na eliminação de micro-organismos resistentes.

Bactérias anaeróbias estritas predominam em infecções endodônticas agudas primárias (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2009). Todavia, a presença de bactérias anaeróbias facultativas também tem sido relatada (JACINTO et al., 2003; SAKAMOTO et al., 2006; SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2013), mas pouco se sabe sobre o seu papel nesse tipo de infecção. Assim, o **Capítulo 2** da tese teve como objetivo identificar e determinar a diversidade genotípica, a sensibilidade

antimicrobiana e os fatores de virulência de anaeróbios facultativos isolados em casos de abscesso apical agudo. Os resultados mostraram pouco isolamento de bactérias anaeróbias facultativas mesmo com o uso de um meio de cultura seletivo para *Streptococcus* spp. Embora o método de cultivo possibilite determinar a resistência antimicrobiana das cepas isoladas (SIQUEIRA JÚNIOR; RÔÇAS, 2005), a sua sensibilidade para verificar a presença de micro-organismos é baixa quando comparado com os métodos moleculares (GOMES et al., 2006). Desse modo, micro-organismos viáveis podem ser não cultiváveis (SIGNORETTO et al., 2000). Todavia, não podemos esquecer que em infecções endodônticas agudas primárias há um predomínio de bactérias anaeróbias estritas (SIQUEIRA JÚNIOR, RÔÇAS, 2009). Em adição, cabe ressaltar que esses microrganismos foram isolados em dentes onde havia a presença de cárie e de lesão periapical. Todos os cuidados para evitar contaminação cruzada entre os ecossistemas da lesão de cárie e da infecção endodôntica foram tomados. A totalidade da dentina cariada foi removida, previamente à execução da coleta microbiana. Esses achados nos fazem concordar com a hipótese sugerida por Montagner et al. (2010), que relataram a possível influência de fatores locais na composição da comunidade microbiana nesse tipo de infecção.

A identificação das cepas isoladas foi realizada com o auxílio de métodos fenotípicos (coloração de Gram, catalase e oxidase) e com o método de ionização por dessorção a laser assistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight - MALDI-TOF) espectrometria de massas (Mass Spectrometry - MS). Em comparação a análise do gene 16S rRNA, o método MALDI-TOF MS além de efetivo, apresenta reduzido tempo para identificação e baixo custo por amostra (BIZZINI; GREUB, 2010). No nosso estudo as seguintes espécies foram identificadas: *Streptococcus* spp, *S. aureus*, *A. viscosus* e *E. faecalis*. No entanto, pode-se observar uma diversidade de espécies entre os pacientes. O isolamento de 24 cepas de *E. faecalis* (24 cepas) em um mesmo paciente, mesmo utilizando um meio de isolamento seletivo para *Streptococcus* spp., foi um resultado inesperado. Vale lembrar que até a década de 90, o *E. faecalis* era classificado como *Streptococcus* spp. (MÄKINEN et al. 1989). O aprimoramento das técnicas de identificação, assim como a observação de um perfil fenotípico diferente fez com que houvesse uma reclassificação desse micro-organismo como *Enterococcus* spp.

Em relação à sensibilidade bacteriana a antibióticos, todas as cepas isoladas foram sensíveis aos antibióticos β -lactâmicos. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* foram resistentes a eritromicina; e *Actinomyces viscosus* não apresentou halo de inibição para esse antibiótico. Por sua vez, o *E. faecalis* não apresentou halo de inibição para a clindamicina, o que demonstra a sua resistência intrínseca ao fármaco. Este achado não pode ser utilizado como informação para desaconselhar o uso de clindamicina no tratamento das infecções endodôntias agudas quando adequadamente indicada (SEGURA-EGEA et al., 2017). Salienta-se que outros micro-organismos fazem parte da comunidade microbiana presente em infecções endodônticas agudas, e que talvez essas espécies sejam sensíveis aos antibióticos comumente prescritos. A eliminação ou redução dessas espécies pode comprometer a presença de outras espécies que delas dependem para manter-se viáveis em infecções no sistema de canais radiculares.

Diante elevado número de cepas de *E. faecalis* isoladas em um mesmo paciente, a sua diversidade genotípica foi avaliada utilizando o PFGE. Além disso, a presença de genes de virulência (*ace*, *gelE*, *efaA*, *esp*, *cylA* e *asa*) nessas cepas foi detectada por meio de PCR. Os resultados do PFGE mostraram que o perfil do fragmento de DNA cromossomal das 24 cepas de *E. faecalis* isoladas foi o mesmo. Porém, houve diferenças entre as cepas no que diz respeito à presença de alguns fatores associados à virulência.

O **Capítulo 3** da presente tese teve como objetivo a elaboração de duas propostas de textos informativos, como material de divulgação, para orientar os cirurgiões-dentistas e os pacientes em relação ao uso de antibióticos em infecções endodônticas agudas, de forma a aplicar as informações obtidas nos capítulos anteriores. Esta abordagem permite a aplicação das informações obtidas a partir da literatura e também produzidas nos capítulos anteriores. De acordo com a WHO (2015), a divulgação, a educação e o treinamento dos profissionais da área da saúde e dos pacientes contribuem para que haja uma adequada conscientização e compreensão do papel de cada ator sobre o surgimento ou o controle da resistência bacteriana. Além disso, acreditamos que a elaboração desse material seja uma forma de integrar a pesquisa acadêmica às necessidades que emergem na sociedade contemporânea, cumprindo um dos diversos papéis da universidade para com a população.

As futuras pesquisas relacionadas à resistência microbiana aos antibióticos em infecções endodônticas devem considerar a abordagem da infecção, do paciente e do prescritor. Novas fontes de medicamentos e investimentos em pesquisa laboratorial e clínica são importantes. A definição do papel de cada micro-organismo na comunidade e não de espécies isoladas também o são. Há necessidade ainda de se realizar ensaios clínicos randomizados para avaliar a prescrição de antibióticos e assim estabelecer novas diretrizes. Porém, é torna-se importante ainda coletar dados que avaliem o tratamento proposto pelo prescritor e a adesão pelo paciente. Essa abordagem permitirá contribuir para a compreensão do impacto social e das implicações econômicas da resistência antimicrobiana na sociedade.

REFERÊNCIAS

AL-AHMAD, A. et al. Food-borne Enterococci integrate into oral biofilm: an *in vivo* study. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, no. 11, p. 1812-9, 2010.

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. **Glossary of endodontic terms** 9. ed. Chicago, 2011. Disponível em <
<http://www.nxtbook.com/nxtbooks/aae/endodonticglossary2016/index.php> >
01/09/2017.

ANDERSON, A. C. et al. *Enterococcus faecalis* from food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation. **Front. Microbiol.**, Lausanne, v. 6, p. 1-14, 2016.

ARAJ, G. F. Available laboratory tests to guide antimicrobial therapy. **J. Med. Liban**, Bayrut, v. 48, no. 4, p. 199-202, 2000.

ARTHUR, R. A. et al. Genotypic diversity of *S. mutans* in dental biofilm formed *in situ* under sugar stress exposure. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 18, no. 3, p. 185-91, 2007.

AYUKEKBONG, J. A.; NTEMGWA, M., ATABE, A. N. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. **Antimicrob. Resist. Infect. Control**, London, v. 6, no. 46, p. 1-8, 2017.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist. Updat.**, Edinburgh, v. 9, no. 3, p. 142-156, 2006.

BAUER, A. W.; PERRY, D. M.; KIRBY, W. M. Drug usage and antibiotic susceptibility of staphylococci. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v. 173, p. 475-80.

BAUMGARTNER, J. C.; XIA, T. Antibiotic Susceptibility of Bacteria Associated with Endodontic Abscesses. **J. Endod.**, Baltimore, v. 29, no. 1, p. 44-7, 2003.

BARBOSA-RIBEIRO, M. et al. Antimicrobial susceptibility and characterization of virulence genes of *Enterococcus faecalis* isolates from teeth with failure of the endodontic failure. **J. Endod.**, Baltimore, v. 42, no. 7, p. 1022-8, 2016.

BIAVASCO, F. et al. 2007 *VanA-Type* Enterococci from humans, animals, and food: species distribution, population structure, *Tn1546* typing and locations, and virulence determinants. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 73, no. 10, p. 3307-19, 2007.

BIZZINI, A.; GREUB, G. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification. **Clin. Microbiol. Infect.**, Londres, v. 16, no. 11, p. 1614-9, 2010

CHOW, J. W. et al. Plasmid-associated helolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental *Enterococcus faecalis*. . **Antimicrob. Agents Chemoth.**, Washington, v. 37, no. 11, p. 2474-77, 1993.

Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 15th ed. Wayne, 2014. Disponível em < http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM100S15.pdf > 01/09/2017.

CRNICH, C. J. et al. Comparison of Pulsed-Gel Electrophoresis and a commercial Repetitive-Element PCR method for assessment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clustering in different health care facilities. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 52, no. 6, p. 2027-32, 2014.

DELBONI, M. G. et al. Diversity of *Enterococcus faecalis* genotypes from multiple oral sites associated with endodontic failure using Repetitive Sequence-based Polymerase Chain Reaction and Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction. **J. Endod.**, Baltimore, v. 43, no. 3, p. 377-82, 2017.

DE PAULA, K. B. et al. Patient automedication and professional prescription pattern in an urgency service in Brazil. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 28, no. 1, p. 1-6, 2014.

DOWSON, C. G.; HUTCHISON, A.; SPRATT, B. G. Extensive remodeling of the transpeptidase domain of penicillin-binding protein 2B of a South African isolate of *Streptococcus pneumoniae*. **Mol. Microbiol.**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 95-102, 1989.

DUGGAN, J. M.; SEDGLEY, C. M. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.** Baltimore, v. 33, no. 7, p. 815-8, 2007.

EATON, T. J.; GASSON, M. J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 67, no. 4, p. 1628-35, 2001

ENDO, M. S. et al. Quantification of cultivable bacteria and endotoxin in post-treatment apical periodontitis before and after chemo-mechanical preparation. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Berlin, v. 31, no. 10, p. 2575-83, 2012.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing**. ed. Copenhagen, 2017. disponível em < http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ > 01/09/2017.

FLYNN, T. R. What are the antibiotics choice for odontogenic infections, and how long should the treatment course last? **Oral Maxillof. Surg. Clin. North Am.**, Filadélfia, v. 23, no. 4, p. 519-36, 2011.

FONTANA, R. et al. Mechanisms of resistance to growth inhibition and killing by beta-lactam antibiotics in enterococci. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 15, no. 3, p. 486-9, 1992.

- FOUAD, A. F. et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 40, no. 9, p. 3223-31, 2002.
- FRANZ, C. M. A. P. et al. Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 88, no. 2-3, p. 105-22, 2003.
- GEORGOPAPADAKOU, N. H. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, Washington, v. 37, no. 10, p. 2045-53, 1993.
- GILMORE, M. S. et al. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytotoxic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 176, no. 23, p. 7335-44, 1994.
- GOMES, B. P. F. A. et al. Microbiological examination of infected dental root canal. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 19, no. 2, p.71-6, 2004.
- GOMES, B. P. F. A. et al. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 102, no. 2, p. 247-53, 2006.
- GOMES, B. P. F. A. et al. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. **J. Endod.**, Baltimore, v. 37, no. 8, p. 1058-62, 2011.
- GOMES, B. P. F. A.; ENDO, M. S.; MARTINHO, F. C. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. **J. Endod.**, Baltimore, v. 38, no. 8, p. 1082-86, 2012.
- HSIAO, W. W. L. et al. Microbial transformation from normal oral microbiota to acute endodontic infections. **BMC Genomics**, London, v. 13, no. 1, p. 345-60, 2012.
- HORIBA, N. Correlation between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canal. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 71, no. 4, p. 492-5, 1991.
- JACINTO, R. C. et al. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, no. 5, p.285-92, 2003.
- KAFIL, H. S. et al. Gentamicin induces *efaA* expression and biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. **Microb Pathog.**, Londres, v. 92, p. 20-5, 2016.
- KHEMALEELAKUL, S. et al. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.**, St. Louis, v. 94, no. 6, p.746-55, 2002.
- KRISTICH, C. J.; RICE, L. B.; ARIAS, C. A. Enterococcal infection – treatment and antibiotic resistance 2014. In: GILMORE, M. S. et al. (ed). **Enterococci: From**

Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014. Disponível em <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190424/>> 01/09/2017.

KURIYAMA, T. et al. Bacteriologic features and antimicrobial susceptibility in isolates from orofacial odontogenic infections. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 90, no. 5, p. 600-8, 2000.

KURIYAMA, T. et al. An outcome audit of the treatment of acute dentoalveolar infection: impact of penicillin resistance. **Br. Dent. J.**, London, v. 198, no. 12, p. 759-63, 2005.

LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, Washington, v. 35, no. 7, p. 1267-72, 1991.

LECLERCQ, R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, v. 34, no. 4, p. 482-92, 2002.

LINS, R. X. et al. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. **J. Dent.**, Kidlington, v. 41, no. 9, p. 779-86, 2013.

LOWE, A. M.; LAMBERT, P. A.; SMITH, A. W. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesion from some oral *Streptococci*. **Infect. Immu.**, Washington, v. 63, no.2, p. 703-6, 1995.

MÄKINEN, P-L et al. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from *Streptococcus faecalis* (Strain 0G1-10). **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, no. 6, p. 3325-34, 1989

MARRA, F. et al. Antibiotics prescribing by dentists has increased. Why? **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v. 147, no.5, p. 320-7, 2016.

MEDEIROS, A. W. et al. Molecular detection of virulence factors among food and clinical *Enterococcus faecalis* strains in South Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 45, no. 1, p. 327-32, 2014.

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, no. 6, p. 475-84, 1981.

MONTAGNER, F.; GOMES, B. P. F.; KUMAR, P. S. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscess. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, no. 9, p. 1475-9, 2010.

MONTAGNER, F. et al. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. **J. Endod.**, Baltimore, v. 38, no. 2, p. 158-62, 2012.

MUNSON, M. A. et al. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 81, no. 11, p. 761-6, 2002.

MURRAY, B. E. β -lactamase producing Enterococci. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, Washington, v. 36, no. 11, p. 2355-9, 1992.

NAKAYAMA, A.; TAKAO, A. β -Lactam resistance in *Streptococcus mitis* isolated from saliva of healthy subjects. **J. Infect. Chemother.**, Tokyo, v. 9, no. 4, p. 321-7, 2003.

NALLAPAREDDY, S. R. et al. Molecular typing of selected *Enterococcus faecalis* isolates: pilot study using Multilocus Sequence Typing and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **J Clin Microbiol.**, Washington, v. 40, no. 3, p. 868-72, 2002.

NASCIMENTO, M. M.; HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. *Streptococcus mutans* genotypes isolated from root and coronal caries. **Caries Res.**, Basel, v. 38, no. 5, p. 454-63, 2004.

OLSSON-LILJEQUIST, B.; NORD, C. E. Methods for susceptibility testing of anaerobic bacteria. **Clin. Infect. Dis.**, Oxford, v. 18, Suppl. 4, s. 293-6, 1994.

OZMERIÇ, N.; PREUS, N. R.; OLSEN, I. Genetic diversity of *Porphyromonas gingivalis* and its possible importance to pathogenicity. **Acta Odontol. Scand.**, Estocolmo, v. 58, no. 4, p. 183-7, 2000.

OZBEK, S. M. et al. Microbiological analysis of root canals associated with periapical abscesses (with pain and swelling) and the antimicrobial susceptibility of isolated bacteria. **Pain Clinic**, Bernardsville, v. 18. no. 6, p. 327-37, 2006.

PADDICK, J. S. et al. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 71, no. 5, p. 2467-72, 2005.

PENAS, P. P. et al. Analysis of genetic lineages and their correlation with virulence genes in *Enterococcus faecalis* clinical isolated from root canal and systemic infections. **J. Endod.**, Baltimore, v. 39, no. 7, p. 858-64, 2013.

PINHEIRO, E. T. et al. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 18, no. 2, p.100-3, 2003.

PINHEIRO, E. T. et al. Phenotypic and genotypic identification of enterococci isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Oral Microbiol. Immunol.**, Copenhagen, v. 21, no. 3, p.137-44, 2006.

PINHEIRO, E. T. et al. Capsule locus polymorphism among distinct lineages of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesion. **J. Endod.**, Baltimore, v. 38, no. 1, p. 58-61, 2012.

POESCHL, P. W. Endodontic pathogens causing deep neck space infections: clinical impact of different sampling techniques and antibiotic susceptibility. **J. Endod.**, Baltimore, v. 37, no 9, p. 1201-5, 2011.

PROVENZANO, J. C. et al. Metaproteome analysis of endodontic infections in association with different clinical conditions. **PLoS ONE.**, San Francisco, v. 8, no. 10, p. 1-9, 2013.

RODRIGUEZ-NÚÑEZ, A. et al. Antibiotic use by members of the Spanish Endodontic Society. **J. Endod.**, Baltimore, v. 35, no. 9, p. 1198-203, 2009.

SAKAMOTO, M. et al. Diversity of Spirochetes in endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, Washington, v. 47, no. 5, p. 1352-7, 2009.

SANTOS, A. L. et al. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. **PLoS ONE.**, San Francisco, v. 6, no. 11, p. 1-8, 2011.

SEDGLEY, C. et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canal. **J. Endod.**, Baltimore, v. 32, no. 3, p. 173-7, 2006.

SHANKAR, V. et al. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. **Infec. Immun.**, Washington, v. 67, no. 1, p. 193-200, 1999.

SILVA, P. Farmacologia. 6. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1- Current molecular Technologies for microbiological diagnosis. **J. Endod.**, Baltimore, v. 31, no. 6, p. 411-23, 2005.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. The microbiota of acute apical abscesses. **J. Dent. Res.**, Washington, v. 88, no. 1, p. 60-5, 2009.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N.; DEBELIAN, G. J. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. **J. Endod.**, Baltimore, v. 37, no. 9, p. 1206-12, 2011.

SIQUEIRA JÚNIOR, J. F.; RÔÇAS, I. N. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 26, no. 2, p. 255-73, 2013.

SMITH, A. M. et al. Genetic Diversity of Penicillin-Binding Protein 2B e 2X Genes from *Streptococcus pneumonia* in South Africa. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, Washington, v. 37, no. 9, p. 1938-44, 1993.

SMITH, A. M.; KLUGMAN, K. P. Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumonie*. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, Washington, v. 39, no. 4, p. 859-67, 1995.

SMITH, A.; JACKSON, M. S.; KENNEDY, H. Antimicrobial Susceptibility of Viridans Group Streptococcal Blood Isolates to Eight Antimicrobial Agents. **Scand. J. Infect. Dis.**, Stockholm, v. 36, no. 4, p. 259-63, 2004.

SOUSA, E. L. R. et al. Quantification of endotoxins in infected root canals and acute apical abscess exudates: monitoring the effectiveness of root canal procedures in the reduction of endotoxins. **J. Endod.**, Baltimore, v. 40, no. 2, p. 177-81, 2014.

SKUCAITE, N. et al. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. **J. Endod.**, Baltimore, v. 36, no. 10, p. 1611-5, 2010.

VAN LEER BUTER, C. C. et al. Prevalence and molecular mechanism of macrolide resistance in β -haemolytic streptococci in the Netherlands. **Int. J. Antimicrob. Agents.** Amsterdã, v. 35, no. 6, p. 590-2, 2010.

VIANNA, M. E. et al. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **Int. Endod. J.**, Oxford, v. 39. n. 6, p. 484-92, 2006.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia clínica para dentistas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance: Global report on surveillance**. Genevensis, 2014). Disponível em <
<http://www.who.int/publications/guidelines/en/>> 01/09/2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global action plan on antimicrobial resistance**. Genevensis, 2015. Disponível em <
<http://www.who.int/publications/guidelines/en/>>01/09/2017

ZINNER, S. H. Antibiotic use: present and future. **New Microbiol.**, Pavia, v. 30, no. 3, p. 321-5, 2007.

ZOLETTI, G. O. et al. Characterization of virulence factors and clonal diversity of *Enterococcus faecalis* isolates from treated dental root canals. **Res. Microbiol.**, Amsterdam, v. 162, no. 2, p. 151-8, 2011.

ZHOU, Q. et al. Genotypic diversity of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in 3-4-year-old children with severe caries or without caries. **Int. J. Paediatric. Dent.**, Oxford, v. 21, no. 6, p. 422-31, 2011.

APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA**Código:** _____**Entrevista Dialogada**

1. Você está sobre tratamento médico? () Sim () Não
Qual? _____.

2. Você já teve uma doença importante ou já fez algum procedimento cirúrgico? () Sim () Não Qual? _____.

3. Você sabe o valor da sua pressão arterial? () Sim () Não
Qual? _____ mmHg/_____ mmHg.

4. Você já teve alguma das doenças sistêmicas listadas abaixo:

a) Febre Reumática () Sim () Não

b) Problema Cardíaco Congênito () Sim () Não

c) Doenças Cardiovasculares () Sim () Não

d) Hepatite ou doença hepática () Sim () Não

e) Convulsões () Sim () Não

f) Diabetes () Sim () Não

g) Artrite ou outro problema articular () Sim () Não

h) Úlcera Estomacal () Sim () Não

i) Insuficiência Renal () Sim () Não

j) AIDS () Sim () Não

k) Câncer () Sim () Não

l) Sangramento excessivo quando se machuca/corta () Sim () Não

m) Anemia () Sim () Não

5. Você faz uso de drogas, álcool ou cigarro? () Sim () Não

Caso Sim: Qual? _____ Frequência: _____

Quantidade: _____

6. Você é alérgico ou já teve reação adversa a:

- a) Anestésicos Locais () Sim () Não
- b) Antibióticos ou penicilina () Sim () Não
- c) Derivados de sulfas () Sim () Não
- d) Ácido acetilsalisílico () Sim () Não
- e) Dipirona () Sim () Não
- f) Contrastes para raios X () Sim () Não
- g) Outros: _____

7. Você está tomando algum medicamento? () Sim () Não

Caso Sim: Qual? _____

8. Mulheres

Você está grávida? () Sim () Não

Você está amamentando no momento? () Sim () Não

Queixa Principal: _____

Em casos de DOR – Características:

- a) Onde está localizada a dor? _____ (Localizada ou Difusa)
- b) Como apareceu a dor? _____ (Provoca ou Espontânea)
- c) Há quanto tempo você tem dor? _____ (Curta ou Longa duração)
- d) Qual a frequência da dor? _____ (Contínua ou Intermitente)

Exame Físico: Elemento Dental e Tecidos Adjacentes – Dente Envolvido

Dente:

- Coroa: () íntegra; () cariada; () restauração direta; () prótese; () fratura.
- Raiz: () com exposição radicular; () sem exposição radicular.
- Periodonto: () saudável; () gengivite; () periodontite.

Avaliação da Condição Pulpar

Teste de Sensibilidade Pulpar ao frio (sob isolamento relativo)

- () Positivo: () dor cessa após a remoção OU () dor não cessa após a remoção;
- () Negativo.

Avaliação dos Tecidos Periapicais

- Teste de Percussão Vertical: () ausência de dor; () sensibilidade; () dor.
- Teste de Palpação Apical: () ausência de dor; () sensibilidade; () dor.
- Edema periapical: () presente; () ausente.
- Mobilidade: () Sim ou () Não.
- Fístula: () Sim ou () Não.

Há mais de um elemento dental que pode ser a causa da dor? () Sim ou () Não

Dente	T. Frio	Perc. Vert.	Perc. Horiz.	Edema	Mobilidade	Origem da Dor?
						() Sim () Não
						() Sim () Não
						() Sim () Não

Exame Radiográfico:

- Coroa Dental: () mineralização pulpar; () atresia da câmara pulpar; () imagem de acidente.

- Raiz: () tratamento endodôntico; () pino; () imagem sugestiva de acidente/fratura radicular.
- Região periapical: () normal; () espessamento do LP; () lesão periapical.

Diagnóstico: _____

- Condição Pulpar: () polpa normal; () pulpíte reversível; () pulpíte irreversível; () necrose pulpar; () hipersensibilidade dentinária.
- Condição Periapical: () sem alteração; () pericementite apical aguda/crônica; () abscesso apical agudo; () lesão periapical crônica; () lesão periapical crônica.
- Patologias de origem não endodôntica: pericoronarites, dores de origem articular, sinusite maxilar.

Tratamento Proposto: _____

Autorização para a realização dos procedimentos

Eu, _____, me responsabilizo pelas informações prestadas, sendo as mesmas verdadeiras. Todas as minhas dúvidas a respeito deste tratamento foram esclarecidas. Fui alertado da possibilidade de ocorrerem acidentes/complicações. Da mesma forma, eu autorizo a execução dos procedimentos a serem realizados.

_____ RG: _____

Assinatura do Paciente ou Responsável

Procedimentos Clínicos	Examinador

Prescrição de Medicação de Uso Sistêmico: () Sim ou () Não. Caso de Sim, detalhar.

Fármaco	Dose	Posologia	Duração

APÊNDICE B – SOLUÇÕES PARA ASSEPSIA DO CAMPO OPERATÓRIO**Tiosulfato de Sódio**

5 g de Tiosulfato de Sódio (pó)
100 ml de Água
(Distribuir em tubos e autoclavar)

Hipoclorito de Sódio 2,5%

25 ml de Hipoclorito de Sódio
75 ml de Água
(Distribuir em tubos autoclavados)

Água Oxigenada 30%

(Distribuir em tubos autoclavados)

APÊNDICE C – MEIO DE TRANSPORTE

1. Descrição do meio

O RTF (Reduced Transport Fluid) é um meio de transporte que tem como função manter a viabilidade dos microrganismos, sem, no entanto, permitir sua multiplicação, de forma a conservar a proporção inicialmente existente na amostra. Geralmente é preparado de maneira a manter um ambiente anaeróbio indispensável para as bactérias anaeróbias estritas e facultativas, francamente predominantes na cavidade bucal. Para a obtenção de um ambiente reduzido, são adicionadas substâncias redutoras, indicadores do potencial de óxido-redução, e o meio é preparado sob fluxo de gases livres de oxigênio. Além disso, na sua formulação existem soluções de sais que garantem um meio isotônico necessário para a estabilidade das células microbianas.

2. Preparo

2.1 Componentes Necessários

a) Solução Mineral de Stock 1:

Fosfato de Potássio Dibásico 0,6% - 0,06g/10 ml.

b) Solução Mineral de Stock 2:

Cloreto de Sódio (NaCl) 1,2% - 0,12 g/10 ml;

Sulfato de Amônio ((NH₄)₂ SO₄) 1,2% - 0,12g /10 ml;

Fosfato de Potássio Monobásico (KH₂PO₄) 0,6% - 0,06 g/10 ml;

Sulfato de Magnésio (MgSO₄) 0,25% - 0,025 g /10 ml.

c) Carbonato de Sódio (Na₂CO₃) 8% - 0,8 g/10 ml (uso opcional somente se exposto a atmosfera CO₂);

d) Dithiothreitol 1% - 0,1g/10 ml;

e) EDTA 0,1 M – 1 ml;

f) Resazurin (opcional) 0,1% - 0,1 ml;

g) H₂O destilada.

2.2 Modo de Preparo para 100 ml de RTF

a) Mix – 81,4 ml de H₂O destilada, 7,5 ml da Solução Mineral de Stock 1; 7,5 ml da Solução Mineral de Stock 2; 1 ml de EDTA 0,1 M e 0,1 ml de Resazurin;

- b) Mix é autoclavado por 15 min;
- c) Adiciona-se ao Mix autoclavado 0,5 ml de Carbonato de Sódio 8% também autoclavado;
- d) Após 2 ml de Dithiothreitol 1% filtrado esterilizado é adicionado;
- e) Dispensa-se assepticamente em recipientes de Transporte.

3. Armazenagem

Colocar 1 ml da solução em cada eppendorf. Proteger da luz com papel alumínio. Armazenar por até 3 meses, a 15-20°C.

APÊNDICE D – MEIOS DE CULTURA

1. **Tryptone Yest Cistine (TYC) Medium (Lab M Limited, Lancashire, Reino Unido)**

1.1 Descrição

Meio seletivo para o cultivo de *Streptococcus mutans*. Meio rico em triptona, extrato de levedura, cistina (TYC) agar; a ele pode ser incorporado bacitracina e sacarose.

1.2 Preparo do Meio

Adicionar 98 g em 1000 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. A solução deve ser esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C antes de distribuir em placas de petri.

1.3 Armazenagem

Armazenar as placas por período de até 7 dias em temperatura de 4°C, preferencialmente no escuro.

2. **Brain Heart Infusion (BHI) Caldo (Neogen, Lansing, Michigan, USA)**

2.1 Descrição

Meio rico para cultivar estreptococos combinando caldo de dextrose e tecido cerebral. Pode ser complementado com antibióticos, quantidades variáveis de cloreto de sódio, extrato de levedura e soro para fornecer um meio rico para bactérias, leveduras e fungos patogênicos. A adição de 0,1% de ágar pode ser usada para diminuir a tensão do oxigênio, proporcionando uma atmosfera para apoiar o crescimento de microorganismos aeróbios, microaerófilos e obrigatórios anaeróbicos.

2.2 Preparo do Meio

Adicionar 37 g do pó em 1000 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. A solução deve ser esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C antes de distribuir em microtubos do tipo eppendorf (1,5 ml).

2.3 Armazenagem

Armazenar a solução em geladeira por no máximo 7 dias.

3. Brain Heart Infusion Caldo (BHI) suplementado com Glicose

3.1 Descrição

Meio de infusão isotônico rico em triptose (uma mistura de carne e petonas do leite) promovendo uma ampla gama de substratos. Uma concentração baixa de glicose é utilizada para estimular o crescimento precoce. É ligeiramente tamponado para impedir a morte rápida de algumas espécies devido à produção de ácido. O pH do meio é $7,4 \pm 0,2$.

3.2 Preparo do Meio

Adicionar 3,7 g do pó em 50 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 minutos e depois agitada. Separadamente deve-se adicionar 1 g de pó de Glicose em 50 ml de água deionizada. As soluções devem ser esterilizadas por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C antes de distribuir em microtubos do tipo eppendorf (1,5 ml). Após, as duas soluções são misturadas para obter um volume final de 100 ml.

3.3 Armazenagem

Armazenar a solução em geladeira por no máximo 7 dias.

4. Brain Heart Infusion (BHI) Agar (KASVI, Curitiba, Paraná, Brasil)

4.1 Descrição

Este meio foi desenvolvido inicialmente para o isolamento de patógenos orais. Com a adição de 5% de sangue desfibrinado, este meio permite o crescimento da maioria dos microrganismos fastidiosos. O fosfato tamponado ajuda neutralizar os ácidos produzidos pela utilização da glicose, mantendo a viabilidade dos microrganismos. Este meio não é recomendado para a determinação das reações glicose em sua composição. O pH do meio é $7,4 \pm 0,2$.

4.2 Preparo do Meio

Adicionar 52 g do pó em 1000 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 minutos e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 minutos e resfriada a 47°C antes de distribuir sobre as placas. Caso deseje, adicionar assepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas placas de Petri.

4.3 Armazenagem

Armazenar as placas por período de até 7 dias em temperatura de 4°C , preferencialmente no escuro.

5. Mueller Hinton Agar (KASVI, Curitiba, Paraná, Brasil)

5.1 Descrição

Meio de cultura recomendado para a realização de antibiograma (teste de sensibilidade), pela técnica de difusão de discos segundo o CLSI. Possui uma substancial fonte de proteínas e carboidratos que proporcionam o desenvolvimento e crescimento de cepas bacterianas de interesse clínico. Além disso, a baixa concentração de timina e timidina e níveis adequados de cálcio e magnésio, evitam falsos resultados de sensibilidade ou resistência.

5.2 Preparo do Meio

Adicionar 36 g do pó em 1000 ml de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min e depois agitada. É esterilizada por autoclavagem a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C antes de distribuir sobre as placas.

5.3 Armazenagem

Armazenar as placas por período de até 7 dias em temperatura de 4°C, preferencialmente no escuro.

APÊNDICE E – CULTIVO E ISOLAMENTO DAS CEPAS

1º passo – Coleta da Saliva e do Canal Radicular do Paciente.

Coletar a saliva em tubos plásticos tipo falcons, e coletar as amostras do canal radicular pelo método da aspiração. As amostras do canal devem ser colocadas em tubo plástico tipo eppendorf contendo 1 ml de RTF.

2º passo - Agitar os tubos plásticos para facilitar a dispersão dos microrganismos.

3º passo – Realizar diluição seriada (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4). Para isso, deve-se colocar 900 µl de BHI caldo em tubos tipo eppendorf e acrescentar 100 µl da amostra mãe e das amostras diluídas:

4º passo – Inocular alíquotas de 50 µl da amostra não diluída e da diluição 10^2 e 10^4 em placas de petri contendo TYC. Colocar em estufa a 37°C e aguardar por um período de 48 h.

5º passo – Analisar a morfologia das colônias em microscópio e fotografar. Cada colônia diferente deverá ser colocada em BHI caldo suplementado com 1% de Glicose. Colocar em estufa a 37°C por 24 h e observar a turvação do meio.

6º passo - Subcultivar as colônias em placas de BHI e BHI sangue para obter a cultura pura. Colocar em estufa a 37°C por 48 h.

APÊNDICE F – COLORAÇÃO DE GRAM

1. Princípios

O mecanismo da coloração de Gram se refere à composição da parede celular. Bactérias Gram-positivas possuem uma espessa camada de peptidoglicano e ácido teicóico, enquanto as bactérias Gram-negativas possuem uma fina camada de peptidoglicano. Diante disso, nas bactérias Gram-positivas o complexo cristal violeta-iodo é retido na parede após aplicação do descorante. Já nas bactérias Gram-negativas o complexo é removido da parede.

2. Componentes

2.1 Cristal violeta

2.2 Solução lugol

2.3 Álcool-acetona (Descorante)

2.4 Fucsina ou safrina (Contracoloração)

3. Procedimentos

- a) Fazer sobre uma lâmina um esfregaço delgado do material em estudo e deixar secar no ar;
- b) Fixar o material na lâmina, utilizando-se o calor da chama no Bico de Bunsen;
- c) Colocar a lâmina em um suporte para a coloração;
- d) Cobrir o esfregaço com a solução de cristal violeta, por 1 min. Lavar em água corrente;
- e) Cobrir o esfregaço com solução de iodo (lugol) de Gram, por 1 min. Lavar em água corrente;
- f) Aplicar o descorante (álcool-acetona) por 15 s sobre a lâmina;
- g) Imediatamente, cobrir a lâmina com contracolorante (fucsina ou safrina), por 30 s a 1 min;
- h) Deixar secar no ar, colocando a lâmina em posição vertical;
- i) Examinar em microscópio óptico, com óleo de imersão, com aumento de 100 vezes.

4. Interpretação dos Resultados

- a) Gram-positiva – roxo;
- b) Gram-negativa – rosa/vermelho

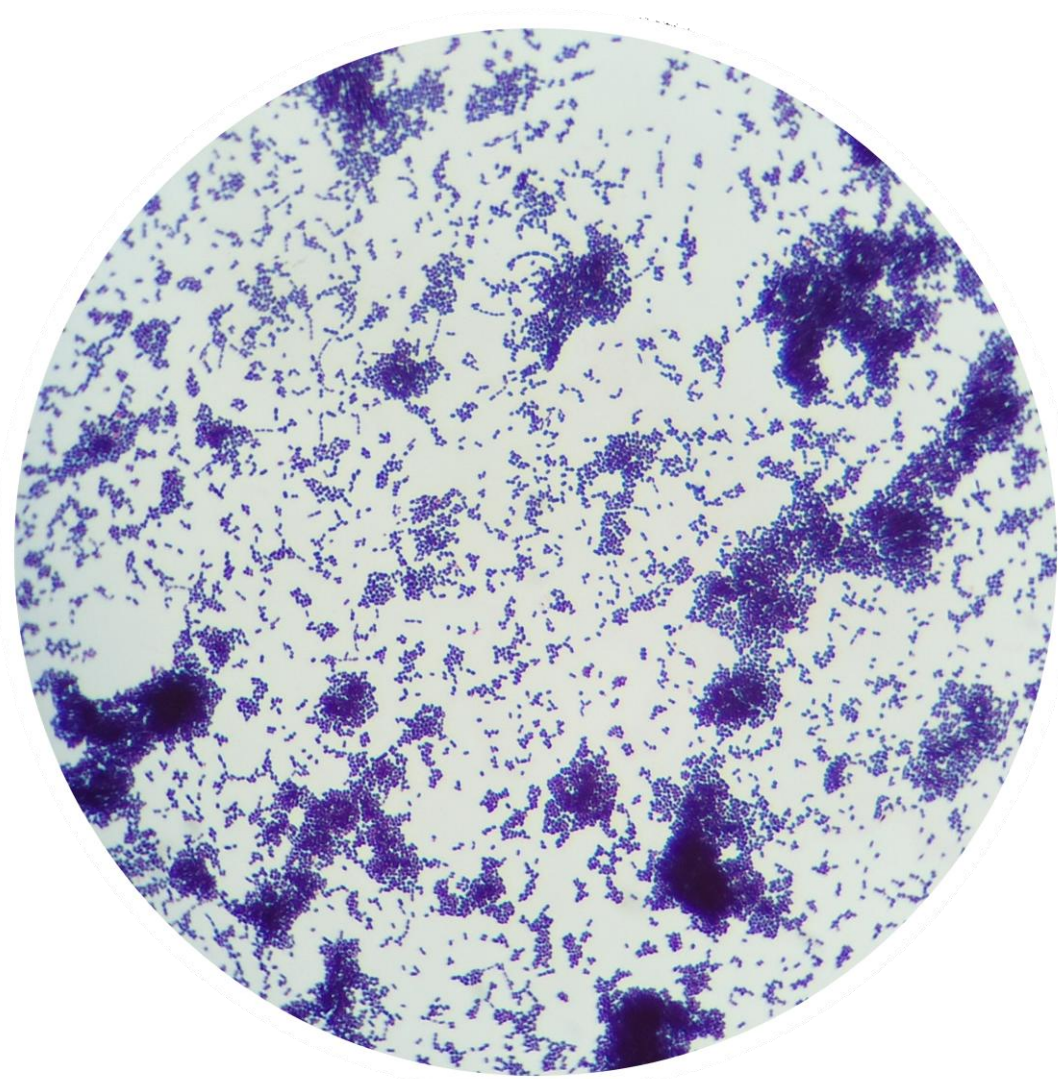


Figura 1. Coloração de Gram. Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE G – TESTE DE CATALASE

1. Princípios

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio.

2. Componentes

Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 3%.

3. Procedimentos

Empregar colônias novas, com 24 h de crescimento, preferencialmente de meios que não contenham ágar. Com uma alça, colher uma porção da colônia e dispensar sobre a lâmina de vidro estéril. Adicionar uma gota de peróxido de hidrogênio 3%.

4. Interpretação dos Resultados

- a) Reação Positiva – formação de bolhas imediata;
- b) Reação Negativa – ausência de formação de bolhas. Formação de bolhas após 20 a 30 s ocorrem, pois algumas bactérias apresentam outras enzimas capazes de degradar peróxido de hidrogênio.

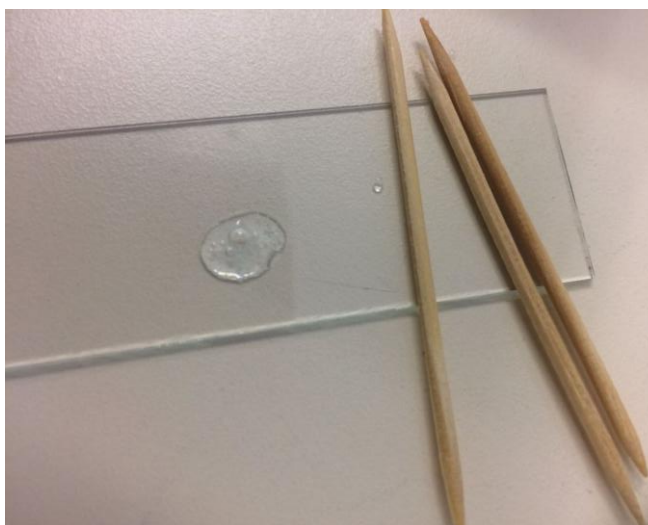


Figura 2. Teste de catalase. Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE H – TESTE DA COAGULASE

1. Princípios

A coagulase é uma enzima que reage com um fator plasmático, e forma um complexo que atua no fibrinogênio do plasma formando a fibrina.

2. Componentes

Plasma de coelho com EDTA.

3. Procedimentos

Colocar 0,5 ml de plasma em um tubo de ensaio. Adicionar uma alçada de colônia diretamente no plasma com EDTA. Incubar por 4 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em estufa ou banho-maria; caso não haja formação de coágulo, incubar por 24 h.

4. Interpretação dos Resultados

- Formação de coágulo inteira ou parcial, identifica *Staphylococcus aureus*.
- Não há formação de coágulo, identifica *Staphylococcus coagulase* negativa.

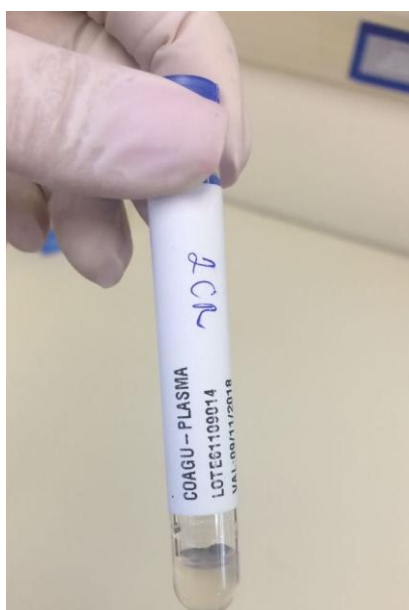


Figura 3. Teste da coagulase. Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE I – IONIZAÇÃO POR DESSORÇÃO A LASER ASSISTIDA POR MATRIZ (MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION TIME-OF-FLIGHT - MALDI-TOF) ESPECTROMETRIA DE MASSA (MASS SPECTROMETRY- MS)

O método foi ajustado do descrito por Moon et al. (2013).

1. Subcultivar bactérias anaeróbias facultativas em BHI agar suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado.
2. Espalhar uma fina camada de cada colônia isolada em um poço da placa (VITEK MS-DS).
3. Cobrir cada colônica com 1 µl de uma solução de matriz (ácida alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix), deixar secar por 1 a 2 minutos a temperatura do ambiente.
4. Após a co-cristalização da matriz, dois pontos são sistematicamente criados para cada colônia.
5. O controle de qualidade é analisado com uma cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739.

A identificação dos generos e espécies são considerados corretos de acordo com os escores: escore ≥ 2.000 identificação a nível de espécies, escore de 1.700 a 1.999 identificação a nível de gênero, e escore < 1.700 foi interpretado como “não identificado”.

APÊNDICE J – SENSIBILIDADE BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

Disco Difusão em ágar

Bactérias anaeróbias facultativas tiveram sua sensibilidade testada para os seguintes antibióticos: BP, CM e EM por meio do teste de disco difusão em ágar. Inóculos foram preparados, transferindo as colônias após crescimento em BHI ágar para BHI caldo, e agitadas, para atingir a turbidez que equivale ao padrão 0,5 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil) para bactérias anaeróbias facultativas, que foi verificado no espectrofotômetro (MARCONI, São Paulo, SP, Brasil).

Placas contendo 4 mm de espessura de Mueller Hinton foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, de maneira uniforme, utilizando um swab esterilizado, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (20 min), os discos contendo os antibióticos (Laborclin, Pinhais, PR, Brasil) foram colocados no centro das placas. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C. Após 20 h de incubação, o halo de inibição foi mensurado com o auxílio de um paquímetro digital (Digimess, São Paulo, SP, Brasil). A interpretação dos valores dos halos de inibição em sensíveis ou resistentes foi realizada seguindo o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines (EUCAST, 2017).

E-test

Cepas de *E. faecalis* tiveram sua sensibilidade testada para os seguintes antibióticos: BP, AC e XL por meio do E-test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Inóculos foram preparados, transferindo as colônias após crescimento em BHI ágar para BHI caldo, e agitadas, para atingir a turbidez que equivale ao padrão 0,5 de McFarland (NEFELOBAC, PROBAC, São Paulo, SP, Brasil) para bactérias anaeróbias facultativas, que foi verificado no espectrofotômetro (MARCONI, São Paulo, SP, Brasil).

Placas contendo 4 mm de espessura de Mueller Hinton foram utilizadas para o repique das cepas. A semeadura foi realizada em toda a extensão da placa, de maneira uniforme, utilizando um swab esterilizado, umedecido na suspensão bacteriana. Após a secagem das placas (20 min), as fitas contendo os antibióticos

foram distribuídas nas placas. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C. Após 20 h de incubação, os valores das CIMs foram determinados pela leitura no ponto de intersecção entre o halo de inibição em forma de elipse e a fita do E-test. O valor de CIM₅₀ e CIM₉₀ foi determinado e a interpretação dos valores das CIMs foi realizada seguindo o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2013).

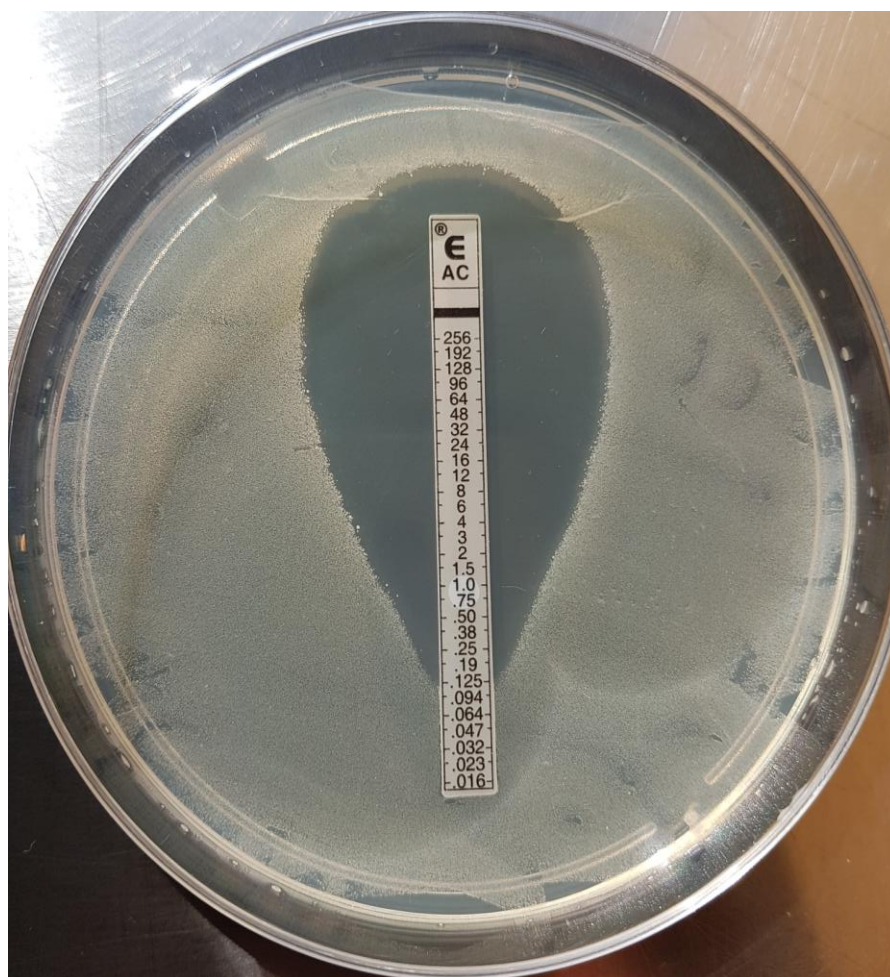


Figura 4. E-test. Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE K – ELETROFORESE POR GEL PULSÁTIL (PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS - PFGE)

Esse método foi ajustado do descrito por Pinto et al. (2013) para bactérias do gênero *Enterococcus* no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

O processo deve ser realizado em ambiente estéril, com material devidamente limpo e esterilizado. É aconselhável também o uso de luvas durante as etapas críticas do procedimento.

Primeiro Dia

1. Verificar a pureza das colônias obtidas e semear 1-3 colônias em 1 ml de BHI caldo (ependorf de 1,5 ml), vortexar e incubar por 5 h;
2. Após, centrifugar a 3000 rpm por 10 min, retirar o sobrenadante vertendo apenas o meio (BHI) dos ependorfs;
3. Adicionar 300 µl de solução tampão PIV (Tris HCl 10 mM, NaCl 1M), homogeneizar bem, e centrifugar a 3000 rpm por 10 min (agitar com ponteira). Esse procedimento deverá ser repetido 3 vezes.
4. Ligar o banho-seco a 52°C para colocar os ependorfs com agarose;
5. Preparar a quantidade necessária de agarose “Low Melting Point” a 1,8% em tampão PIV (0,18 g em 10 ml de PIV). Fazer a solução em um bécker de 50 ml (colocar esse becker em banho-maria dentro de outro Becker (100 ml) com 20 ml de água), dissolvendo-a em micro-ondas: 10 s, 8 s, 4 s, 4 s cuidar para não virar a solução. Distribuir 300 µl em cada um dos 13 ependorfs NOVOS de 1,5 ml para manter a agarose fundida a 52°C no banho-maria durante a execução desta etapa da técnica.
6. Esterilizar canudos em micro-ondas (3 vezes de 10 min).
7. Após a terceira centrifugação com PIV, adicionar 300 ul de PIV no precipitado e homogeneizar. Adicionar essa suspensão (PIV + precipitado bacteriano) nos microtubos com agarose “Low Melting Point” 1,8% homogeneizar rapidamente com ponteira, distribuir esses 600 ul em molde evitando a

formação de bolhas e o deslocamento da suspensão diretamente para o fundo do canudo. Manter os canudos com agarose a 4°C por cerca de 20 min ou em temperatura ambiente por mais tempo.

8. Desligar o banho-seco.
9. Preparar a solução de lise (EC) +ENZIMAS em um falcon de 50ml estéril:
 - 28 ml da EC (Tris HCl 6Mm; NaCl 2M; EDTA tetrassódico 100Mm; Brij-58 0,5%; desoxicolato de sódio 0,2%; sarcosil 0,5%) – DESCONTAR/RETIRAR 560 µl da mutanolisina;
 - 560 µl da mutanolisina (está no congelador da geladeira);
 - 0,028 g de lisozima (está no congelador da geladeira);

*Concentração final das enzimas na solução: mutanolisina 20 ug/ml (solução estoque a 1mg/ml e suspender em EC).

Distribuir 2 ml da solução EC+ENZIMAS em cada um dos 13 tubos de ensaio novos. Agitar bem a solução antes de pipetar nos tubos.

10. Após solidificação, cuidadosamente, empurrar a agarose solidificada e proceder com o corte, com auxílio de um bisturi previamente esterilizado, dos moldes de forma a obter pequenos “plugs” circulares de aproximadamente 2 mm, depositando-os nos tubos com 2 ml de solução EC+ ENZIMAS.

Segundo Dia

Incubar a 37°C ou overnight em shaker a velocidade moderada.

Terceiro Dia

1. Preparar a solução ESP (ES+PROTEÍNASE) em um falcon de 50 ml estéril:
 - Pipetar 56 ml da Solução ES (EDTA tetrassódico 0,5M; Lauril sarcosinato de sódio) - DESCONTAR/RETIRAR 280 µl referente à proteínase K;
 - 280 µl de proteínase K (está na porta da primeira geladeira do 202);

(Adicionar 10 μ l/ml de proteinase K (a partir de uma solução 20 mg/ml) em 2 ml de solução ES previamente preparada (concentração final de proteinase de 0.2 mg/ml).

2. Remover a solução de lise com as enzimas que ficou a 37°C com o auxílio de um pente previamente lavado com álcool 70%.
3. Ligar o shaker a 50°C.
4. Colocar 2 ml da sol. ESP em cada tubo (13) contendo os plugs.
5. Incubar a 50°C por 1 h no shaker;
6. Substituir a solução contendo os plugs (com auxílio de pipeta ou pente) por nova solução ESP (com proteinase K) e repetir a incubação 50°C por 1 h.
7. Remover a solução ESP com auxílio de pipeta ou pente.
8. Distribuir 2 ml de tampão TE (Tris HCl 10 mM; EDTA dissódico 0,1mM) para cada amostra.
9. Incubar a 50°C com agitação (estufa) por 20 min.
10. Remover o tampão TE antigo e adicionar mais 2 ml de tampão novo.
11. Repetir esta lavagem por mais 4 vezes.
12. Após essas lavagens, os plugs podem ser guardados a 4°C em tampão TE até o uso, com validade de 2 anos. Ou pode-se dar continuidade ao processo com um plug.

Quarto Dia

1. Troca do TE e deixa por 30 min.
2. Preparar em um tubo estéril **uma** vez a quantidade necessária de tampão para a enzima de restrição (10 μ l de tampão 10X + 10 μ l RED + 80 μ l de água Milli Q estéril – 1 amostra), observando que o acréscimo de RED depende do fabricante da enzima, caso não seja necessário usa-se (10 μ l de tampão 10X + 90 μ l de água Milli Q estéril). O cálculo deve ser realizado de acordo com o número de amostras.

SOLUÇÃO tampão para a *SmaI*

- 2520 μl (2 ml + 520 μl) de água milli Q.
 - 280 μl do tampão da *SmaI*.
 - Fazer solução em tubinho com tampa preta.
3. Distribuir 100 μl em 13 eppendorfs novos.
 4. Transferir um plug para o interior de um microtubo estéril de 1,5 ml, com auxílio de uma alça azul de primeiro uso. Incubar por 20 min a 25°C (para a enzima *SmaI*). OBS: A temperatura ótima desta enzima de restrição varia de acordo com o fabricante, conferir sempre este dado.
 5. Substituir o tampão por um novo (100 μl) e adicionar diretamente no microtubo 20U da enzima de restrição *SmaI* (2 μl da enzima na concentração de 10U/ μl – homogeneizar bem) para cada 100 μl de tampão diluído.
 6. Incubar a 37°C por 24 h.

Quinto Dia

1. Diluir TBE 5X para fazer 2 litros de TBE 0,5X em água milli-Q estéril (ERLENMEYER de 2 litros): 200 ml de TBE 5X + 1800 ml de água.
2. Adicionar 0,007612 g de tiouréia (concentração no tampão de 50 μM).
3. No Laboratório de Microbiologia Molecular (1 h antes do término da incubação):
 - Trazer para a Microbiologia Molecular 2 litros de TBE 0,5X.
 - Deixar o ar-condicionado da Microbiologia Molecular a 17°C.
 - Retirar a água da mangueira.
 - Verter os 2 litros restantes de TBE 0,5X na cuba (no lado) e ligar o aparelho de PFGE na seguinte ordem:
 - ✓ Ligar a fonte (botão preto - POWER).

- ✓ Ligar a mangueira (botão laranja - PUMP) – esperar passar tudo- verificar se o tampão está circulando (fazer uma bolha e acompanhar o seu trajeto).
- ✓ Ligar o cooler a temperatura de 14°C/12°C – cooling module.
- ✓ Verificar a velocidade da bomba (tem que estar em 80) - BIORAD variable speed pump.
- ✓ Trazer suporte para gel.

4. No Laboratório 202:

- Montar os suportes para o gel (pente para trás), prestando atenção para o detalhe do “cartão da Fernanda”. Montar o gel em um local sem trepidação e nivelado.
- Preparar gel 1% em um volume de 100 ml de TBE 0,5X (pesar em erlenmeyer, adicionar TBE 0,5X sem tiouréia e dissolver em micro-ondas, 20 s, 15 s e 10 s).
- Esfriar um pouco o erlenmeyer contendo o gel 1%.
- Verter o conteúdo, deixando o pente no lugar.
- Retirar as bolhas com uma ponteira empurrando-as para o canto e estourando-as.
- Deixar o gel endurecer e colocar em uma geladeira por 30 min (Cobrir com um plástico).
- Pegar a seringa contendo o DNA fragmentado padrão.
- Nos slots destinados aos padrões de peso molecular, cortar com um bisturi (reservado para o padrão) um fino slice da seringa. Com auxílio de uma alça bacteriológica de “1º uso”, empurrar o slice para o interior do slot.
- Retirar o conteúdo dos eppendorfs contendo o tampão diluído e enzima de restrição e os plugs, deixando estes últimos;
- Derreter os plugs a 72°C +/- 5 min – dar um peteleco para ver se dissolveu bem.
- Pegar 40 µl (ATENÇÃO: verificar a capacidade máxima do slot e o tamanho do plug antes) do plug derretido e colocar nos slots.

OBS: Pente de 10 slots - 60/70 µl

Pente de 15 slots – 40 μ l

Pente de 20 slots – 35 μ l

- Desligar banho-seco;

5. No Laboratório de Microbiologia Molecular:

- Desligar os aparelhos na ordem inversa a que ligou:
 - ✓ Ligar o cooler a temperatura de 14°C/12°C;
 - ✓ Ligar a mangueira (botão laranja - PUMP);
 - ✓ Ligar a fonte (botão preto - POWER).
- Após completar todos os slots desejados, retirar as laterais do suporte (de cima e de baixo). Empurrar a base preta cuidadosamente para retirada dos moldes laterais.
- Com auxílio de um papel toalha, limpar toda a agarose residual do gel para evitar entupimento do fluxo da cuba.
- Colocar a base preta + gel no centro da cuba certificando-se que está devidamente encaixado.
- Ligar os três botões de novo. Ligar o aparelho de PFGE: (ligar o estabilizador na tomada)
- Programar a corrida:

Block – 1

Initial time – 5 s

Final time – 35 s

Run time – 20 s

Block – 2

Initial time – 5 s

Final time – 10 s

Run time – 4 h

Volt – 6 V/cm

Included angle - 120

- Ligar a corrida apertando o RUN da fonte.

Sexto Dia

1. No Laboratório 202

- Encher um erlenmeyer com 2 litros de água ultrapura.

- Alíquotar 40 µl de Brometo de Etídio em um eppendorf.

2. No Laboratório de Biologia Molecular

- Após o período de corrida, desligar o aparelho:
 - ✓ desligar o aparelho de temperatura (COOLING MODULE);
 - ✓ desligar a bomba (PUMP);
 - ✓ desligar a fonte (POWER do CHEF-DRII).
- Preparar o brometo de etídio (15 µl + 300 ml de água ultrapura), na bandeja destinada a coloração do gel).
- Para tirar o gel, coloque o dedo no vértice e por baixo da bandeja preta. Jogue somente o gel na bandeja com o brometo de etídeo. Deixe corando por 20 min.
- Esvaziar a cuba com tampão de corrida colocando a mangueira da direita e encher o depósito de TBE. Descartar depois na pia.
- Desconectar a mangueira da esquerda e escoar o líquido.
- Ligar botões preto e laranja para esvaziar o líquido presente nas mangueiras.
- Tentar fazer vácuo na mangueira de escape para retirar qualquer pedaço de agarose que possa entupir o fluxo. Inclinar a cuba com auxílio de uma caixa de ponteira.
- Colocar o restante de água ultrapura 1600 ml para lavar a cuba e ligar botões preto e laranja para circular o líquido na cuba e nas mangueiras.
- Desligar botões preto e laranja e retirar água da cuba.
- Ligar botões preto e laranja para esvaziar líquido das mangueiras.
- Desconectar a mangueira da esquerda e escoar o líquido.
- Secar a cuba com papel-toalha ou algodão.
- Após os 30 min corando o gel, visualizar em um trans-luminador e fotografar no computador.

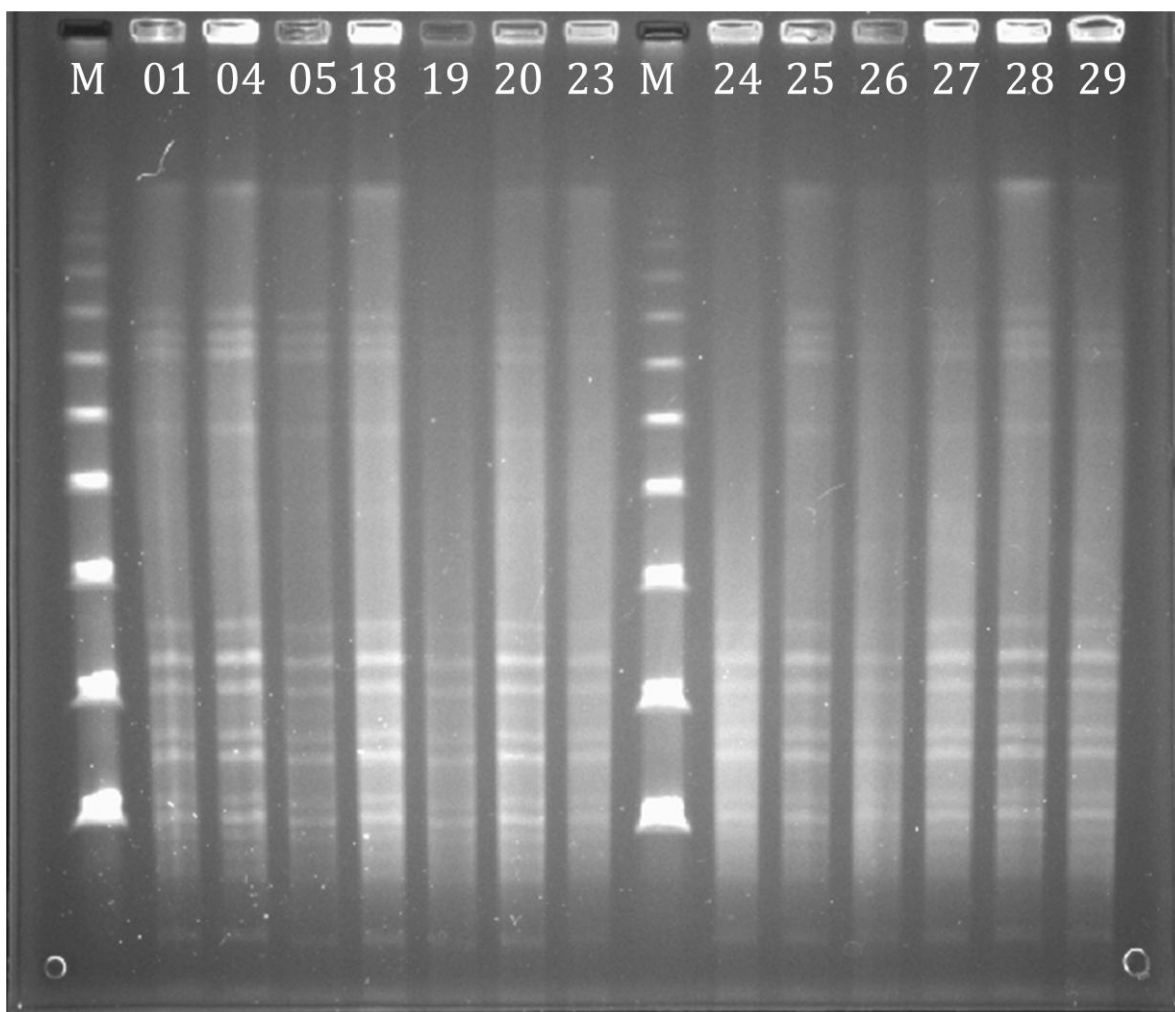


Figura 4. Imagem do gel de agarose após PFGE. Fonte: Próprio autor.

SOLUÇÕES NECESSÁRIAS

PIV

- ✓ 14,61 g de NaCl 1M.
- ✓ 1,25 ml de Tris/HCl 10 mM (tem sol. ESTOQUE Bruna).
- ✓ Completar com 250 ml de água ultrapura (~247,5 ml).
- ✓ Ajustar pH entre 7 e 8.
- ✓ Autoclavar.
- ✓ Fazer em proveta a solução.

SOLUÇÃO DE LISE (EC)

- ✓ 1,5 ml de Tris/HCl 6Mm com pH: 7-8 (tem sol. ESTOQUE Bruna).
- ✓ 29,22 g de NaCl 1M.
- ✓ 50 ml de EDTA 100 Mm com pH: 7-8 (tem sol. ESTOQUE Bruna.)
- ✓ 2,5 g de Brij-58 0,5% (E6).
- ✓ 1 g de desoxicolato sódio 0,2% (D5).
- ✓ 2,5 g de lauril sarcosinato de sódio 0,5% (D1).
- ✓ Completar para 500 ml de água ultrapura (~397 ml).
- ✓ Filtrar com a bomba a vácuo (autoclavar filtro, membrana, duran de 1litro, Becker 1 litro).
- ✓ pH: 7-8.

TE

- ✓ 1,25 ml de Tris/HCl 10 mM com pH: 7-8 (tem sol. ESTOQUE Bruna).
- ✓ 0,025 ml (25 µl) de EDTA 0,1mM com pH: 7-8 (tem sol. ESTOQUE Bruna).
- ✓ Completar para 250 mL de água ultrapura (~247,45 ml).
- ✓ Autoclavar.
- ✓ pH: 7-8.

ES

- ✓ 2,5g de lauril sarcosinato de sódio (D1).
- ✓ Completar com 250 ml de solução EDTA 0,5M com pH: 7-8.
- ✓ Fazer na proveta 250 ml
- ✓ Filtrar com a bomba a vácuo (autoclavar filtro, membrana, duran de 1litro, Becker 1 litro);

EDTA 0,5M

- ✓ 46,5g de EDTA 0,5M (B8)
- ✓ 250 ml de água ultrapura
- ✓ Ajusta pH: 7-8
- ✓ Filtrar com a bomba à vácuo (autoclavar filtro e membrana)
- ✓ Colocar umas 50 pastilhas de NaOH para dissolver bem o EDTA, pois o EDTA não dissolve em pH ácido).

SOLUÇÃO ES + PROTEÍNASE K (ESP)

- ✓ 56 ml da Solução ES (DESCONTAR/RETIRAR 280µl referente à proteínase K).
- ✓ 280 µl de proteínase K (está na porta da primeira geladeira do laboratório 202).

SOLUÇÃO tampão para a *SmaI*

- ✓ 2520 µl (2 ml + 520 µL) de água Milli-Q.
- ✓ 280 µl do tampão da *SmaI*.

TBE 5X

- ✓ Tris base: 60,6 g.
- ✓ Ac. Bórico (B13): 30,9 g.
- ✓ EDTA (B8): 3,722 g.
- ✓ Água Milli-Q: 1000 ml.
- ✓ pH: 8,4.
- ✓ Filtrar solução.

APÊNDICE L – PURIFICAÇÃO DE DNA

1. Aquecer banho d'água a 56°C (Dubnoff).
 2. Limpar bancada de trabalho com hipoclorito. Após, passar papel/gaze com álcool 70%.
 3. Separar material:
 - Amostras descongeladas;
 - Pipetas/ponteiras;
 - Eppendorfs 1,5 ml;
 - Rack para eppendorf;
 - Água Milli-Q;
 - Canetas para marcação;
 - Vidros para descarte: seco e líquido;
 - Gaze/álcool 70%/papel absorvente;
 - Homogenizador/copo de café/fita adesiva;
 - Kit extração;
 - EPIs (touca, máscara, luvas).
 4. Nomear eppendorfs
 5. Preparo das amostras mãe (cepas de *E. faecalis* isoladas):
 - Centrifugar as amostras (200 µl) a 8000 rpm/10 min;
 - Remover o sobrenadante;
 - Acrescentar 150 µl de água Mili-Q;
 - Agitar.
 6. Adicionar 180 µl de ATL (solução 01).
 7. Adicionar 20 µl de Proteinase K (solução 02).
 8. Agitar levemente no homogenizador.
 9. Levar ao banho d'água 56°C por 2 h.
- OBS: após, lembrar-se de alterar a temperatura do banho d'água para 70°C.
10. Passar gaze com álcool 70% nos eppendorfs antes de posicioná-los no rack.
 11. Adicionar 200 µl de AL (solução 03) e agitar.
 12. Levar ao banho d'água 70°C por 10 min.

OBS: após, lembre-se de voltar a temperatura do banho d'água para 37°C para poder desligar.

13. Passar gaze com álcool 70% nos eppendorfs antes de posicioná-los no rack.

14. Dispor os tubos e colunas do kit no rack, e nomear.

15. Adicionar 200 µl de Etanol 100% (solução 04) e agitar.

16. Transferir 500 µl da amostra para o filtro/coluna.

17. Levar a centrífuga “grande” por 2 min (8000 rpm), distribuindo internamente de forma equilibrada, com a dobradiça do eppendorf para fora.

18. Descartar o líquido do tubo: remover a coluna, despejar o líquido no descarte, bater o tubo no papel absorvente, limpar a abertura numa gaze com álcool 70%, e reposicionar a coluna no mesmo tubo.

19. Transferir o restante da amostra para o filtro/coluna.

20. Levar a centrífuga “grande” por 2 min (8000 rpm), distribuindo internamente de forma equilibrada, com a dobradiça do eppendorf para fora.

21. Trocar o tubo (despejar o líquido previamente no descarte).

22. Adicionar 500 µl de AW1 (solução 05).

23. Levar a centrífuga “grande” por 2 min (8000 rpm), distribuindo internamente de forma equilibrada, com a dobradiça do eppendorf para fora.

24. Descartar o líquido do tubo: remover a coluna, despejar o líquido no descarte, bater o tubo no papel absorvente, limpar a abertura numa gaze com álcool 70%, e reposicionar a coluna no mesmo tubo.

25. Adicionar 500 µl de AW2 (solução 06).

26. Levar a centrífuga “pequena” por 3 min.

OBS: Se a centrífuga parar antes, apertar o start de novo.

27. Nomear eppendorfs “finais”.

28. Descartar os tubos (despejar o líquido previamente no descarte!) e posicionar as colunas nos eppendorfs finais.

29. Adicionar 100 µl de AE (solução 07) com a ponteira próxima a membrana/filtro (cuidado para não romper).

30. Esperar 3 minutos (a partir da última pipetagem).

31. Levar a centrífuga “grande” por 2 min (8000 rpm), distribuindo internamente de forma equilibrada, com a dobradiça do eppendorf para fora e a tampa do eppendorf final voltada para dentro.

32. Descartar a coluna, fechar e armazenar (-20°C) os eppendorfs finais com o DNA extraído.

*Podem ser realizadas no máximo 12 extrações por grupo (limite da centrífuga).

APÊNDICE M – DETECÇÃO DO GENE 16S POR PCR

A presença do gene 16S foi verificada para confirmar a otimização da extração de DNA das células bacterianas.

Primer 16S universal (acordo com Nadkarni et al., 2002)

Forward: 5' TCCTACGGAGGCAGCAG 3'

Reverse: 5' GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3'

Preparo do Primer

SOLUÇÃO MÃE

Diluição do primer de acordo com o fabricante para obter uma concentração de 100µM.

SOLUÇÃO DE TRABALHO

Preciso saber o quanto de volume tenho que pegar da SOLUÇÃO MÃE e misturar com água milli-Q para obter uma SOLUÇÃO DE TRABALHO a 10µM num volume de 50µl.

$$M_{\text{mãe}} \times V_{\text{mãe}} = M_{\text{trabalho}} \times V_{\text{trabalho}}$$

$$100 \mu\text{M} \times V_{\text{mãe}} = 10 \mu\text{M} \times 50 \mu\text{l} \quad \Rightarrow \quad V_{\text{mãe}} = 5 \mu\text{l}$$

Pegar 5 µl da SOLUÇÃO MÃE + 45 µl de água Milli-Q.

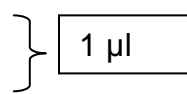
A molaridade dos primers é 0,2 µM. A concentração dos nossos primers é 10 µM. Então, quanto devemos utilizar dos nossos primers?

$$M_{\text{primer}} \times V_{\text{primer}} = M_{\text{artigo}} \times V_{\text{artigo}}$$

$$10 \mu\text{M} \times V_{\text{primer}} = 0,2 \mu\text{M} \times 25 \mu\text{l}$$

$$V_{\text{primer}} = 0,5 \mu\text{l}$$

Logo, em uma reação de 30 μ l deve-se utilizar:

- 0,5 μ l Primer Forward
 - 0,5 μ l Primer Reverse
- 
- A right-facing curly bracket groups the two list items above. To the right of the bracket is a rectangular box with a thin black border containing the text "1 μ l".

Preparo da Mistura para Reação de PCR

- 23 μ l Taq Master Mix
- 0,5 μ l *Primer* Forward
- 0,5 μ l *Primer* Reverse
- 1 μ l de DNA

Condição para PCR

- Desnaturação Inicial – 94°C, 5 min.
- 35 ciclos – Desnaturação (94°C, 30 s), Anelamento (60°C, 30 s), Extensão (72°C, 2 min).
- Extensão Final – 72°C, 3 min).

Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose (Invitrogen, São Paulo, Brasil) corado com Syber Green (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil). Para isso 1 μ l de Loading Dye foi adicionado a 2,5 μ l do produto da reação, e colocado no slot do gel de agarose. O tamanho dos fragmentos gerados por PCR foi comparado com um marcador GelPilot® Plus Ladder (Qiagen®, Valencia, CA, USA). Para isso 2,5 μ l do marcador foi colocado no primeiro slot. A corrida em eletroforese foi regulada na voltagem de 100 volts, 120 miliampère e 100 watts por 60 min. A presença de bandas positivas visualizada sob luz ultravioleta determinou a presença do gene.

APÊNDICE N – DETECÇÃO DOS GENES DE VIRULÊNCIA POR PCR

Genes de Virulência

- *ace* - collagen binding protein tem haver com o estabelecimento do *E. faecalis* em dentina infectada;
- *asa*; *asa373* - aggregation substance facilita da troca de plamídeo e tem haver com a adesão da bactéria a matris extracelular;
- *cyIA* – hemolysin activator destruição de eritrócitos e células de defesa;
- *efaA* – antigen endocarditis tem haver com adesina em endocardites;
- *esp* – protein surface tem haver com a interação do *E. faecalis* dentro dos biofilmes;
- *gelE* – gelatinase tem a capacidade de clivar insulina, caseína, hemoglobina, colágeno, gelatina e fibrina;

Table 1. Primers usados no PCR para detectar genes de virulência de *E. faecalis* (BARBOSA-RIBEIRO et al., 2016)

Gene	Primers pairs (5'-3')	Amplicon size (bp)	Concentração
<i>ace</i> (collagen-binding protein)	F: GGAATGACCGAGAACGATGGC R: GCTTGATGTTGGCCTGCTTCCG	616	25N
<i>asa</i> (aggregation substances)	F: CCAGCCA ACTATGGCGGACTAC R: CTGGGTGTGATTCCGCTGTTA	619	25N
<i>cyIA</i> (hemolysin activator)	F: GACTCGGGGATTGATAGGC R: GCTGCTAAAGCTGCGCTTAC	688	25N
<i>efaA</i> (endocarditis antigen)	F: GCCAATTGGGACAGACCCTC R: CGCCTTCTGTTCTTCTTTGGC	688	25N
<i>esp</i> (surface protein)	F: TTGCTAATGCTAGTCCACGACC R: GCGTCAACACTTGCATTGCCGA	932	25N
<i>gelE</i> (gelatinase)	F: ACCCCGTATCATTGGTTT R: ACGCATTGCTTTTCCATC	405	25N

Preparo dos Primers

SOLUÇÃO MÃE

Diluição dos primers de acordo com o fabricante para obter uma concentração de 100 μM .

- *ace* – Forward 455 μl de água milli-Q
Reverse 487 μl de água milli-Q
- *asa*; *asa 373* - Forward 452 μl de água milli-Q
Reverse 408 μl de água milli-Q
- *cyIA* - Forward 467 μl de água milli-Q
Reverse 574 μl de água milli-Q
- *efaA* - Forward 551 μl de água milli-Q
Reverse 601 μl de água milli-Q
- *esp* – Forward 575 μl de água milli-Q
Reverse 532 μl de água milli-Q
- *gelE* – Forward 555 μl de água milli-Q
Reverse 623 μl de água milli-Q

SOLUÇÃO DE TRABALHO

Preciso saber o quanto de volume tenho que pegar da SOLUÇÃO MÃE e misturar com água milli-Q para obter uma SOLUÇÃO DE TRABALHO a 10 μM num volume de 100 μl .

$$M_{\text{mãe}} \times V_{\text{mãe}} = M_{\text{trabalho}} \times V_{\text{trabalho}}$$

$$100 \mu\text{M} \times V_{\text{mãe}} = 10 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{l} \quad \Rightarrow \quad V_{\text{mãe}} = 10 \mu\text{l}$$

Pegar 10 μl da SOLUÇÃO MÃE + 90 μl de água milli-Q.

Preparo da Mistura para Reação de PCR

De acordo com Barbosa-Ribeiro et al. (2016) para a realização de uma reação de 30µl deve-se utilizar:

- 3 µl 10XPCR buffer
 - 100 µmol/l de dNTPs
 - 2,4 mmol/l MgCl₂
 - 2U Tap Polimerase
- $\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\}$
- MASTER MIX
- 6 pmol *Primer* Forward
 - 6 pmol *Primer* Reverse
 - 100-200 ng total de DNA (1µl)

Para os PRIMERS, o autor usou:

6 pmol em 30 µl, ou seja:

$$6\text{pmol}/30\ \mu\text{l} = 0,2\ \text{pmol}/\mu\text{l} = 0,2\ \mu\text{M}$$

Então temos que a molaridade dos primers usada é 0,2 µM. A concentração dos nossos primers é 10 µM. Então, quanto devemos utilizar dos nossos primers?

$$M_{\text{primer}} \times V_{\text{primer}} = M_{\text{artigo}} \times V_{\text{artigo}}$$

$$10\ \mu\text{M} \times V_{\text{primer}} = 0,2\ \mu\text{M} \times 30\ \mu\text{l}$$

$$V_{\text{primer}} = 0,6\ \mu\text{l}$$

Logo, em uma reação de 30 µl deve-se utilizar:

- 0,6 µl *Primer* Forward
 - 0,6 µl *Primer* Reverse
- $\left. \begin{array}{l} \\ \end{array} \right\}$
- 1,2 µl

Table 2. Condições para PCR.

Gene	Reação de PCR	Referência
<i>ace</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação Inicial (95°C, 5 min) • 30 ciclos de desnaturação (95°C, 1 min), anelamento (58°C, 1 min), extensão (72°C, 1 min); • Extensão Final (72°C, 10 min). 	Creti et al., 2004.
<i>asa e</i> <i>asa373</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação Inicial (95°C, 5 min); • 30 ciclos de desnaturação (95°C, 1 min), anelamento (58°C, 1 min), extensão (72°C, 1 min); • Extensão Final (72°C, 10 min). 	Creti et al., 2004.
<i>cylA</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação Inicial (94°C, 4 min); • 30 ciclos de desnaturação (95°C, 1 min), anelamento (58°C, 1 min), extensão (72°C, 1 min); • Extensão Final (72°C, 10 min). 	Creti et al., 2004.
<i>efaA</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação Inicial (95°C, 5 min); • 30 ciclos de desnaturação (95°C, 1 min), anelamento (58°C, 45 s), extensão (72°C, 1 min); • Extensão Final (72°C, 10 min). 	Creti et al., 2004.
<i>esp</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação Inicial (95°C, 5 min); • 30 ciclos de desnaturação (95°C, 1 min), anelamento (63°C, 1 min), extensão (72°C, 1 min); • Extensão Final (72°C, 10 min). 	Shankar et al 1999.
<i>gelE</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Desnaturação Inicial (95°C, 5 min); • 30 ciclos de desnaturação (95°C, 1 min), anelamento (52°C, 1 min), extensão (72°C, 1 min); • Extensão Final (72°C, 10 min). 	Shankar et al., 1999.

Os produtos da reação foram analisados em gel de agarose (Invitrogen, São Paulo, Brasil) corado com Syber Green (Applied Biosystems, São Paulo, SP, Brasil). Para isso 1 µl de Loading Dye foi adicionado a 2,5 µl do produto da reação, e colocado no slot do gel de agarose. O tamanho dos fragmentos gerados por PCR foi comparado com um marcador GelPilot® Plus Ladder (Qiagen®, Valencia, CA, USA). Para isso 2,5 µl do marcador foi colocado no primeiro slot. A corrida em eletroforese

foi regulada na voltagem de 100 volts, 120 miliampère e 100 watts por 60 min. A presença de bandas positivas vizualizada sob luz ultravioleta determinou a presença do gene.

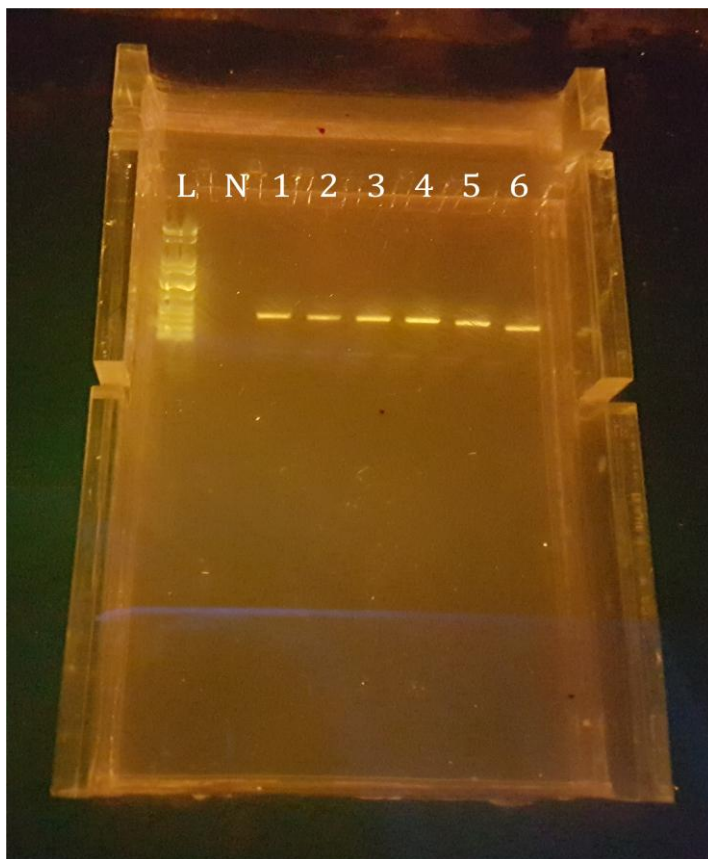


Figura 6. PCR gene *ge/E*. Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE O – TESTE DA HIDRÓLISE DA GELATINA

O teste da hidrólise da gelatina foi adaptado do método proposto por Anderson et al. (2016)

1. Princípios

Alguns microrganismos têm a capacidade para produzir a gelatinase, que atua hidrolisando a gelatina em aminoácidos. Quando ocorre a degradação não se consegue restaurar as características de gel da gelatina, mesmo a baixas temperaturas.

2. Componentes

BHI caldo e Gelatina

3. Procedimentos

Inocular um meio de cultura nutritivo, em tubo, suplementado com 12% de gelatina. Incubar o inóculo a 37°C por 48 h. Após a incubação as culturas são colocadas em refrigerador a 4°C por 24 h.

4. Interpretação dos Resultados

- a) Negativo – meio se resolidifica;
- b) Positivo – meio não se resolidifica.

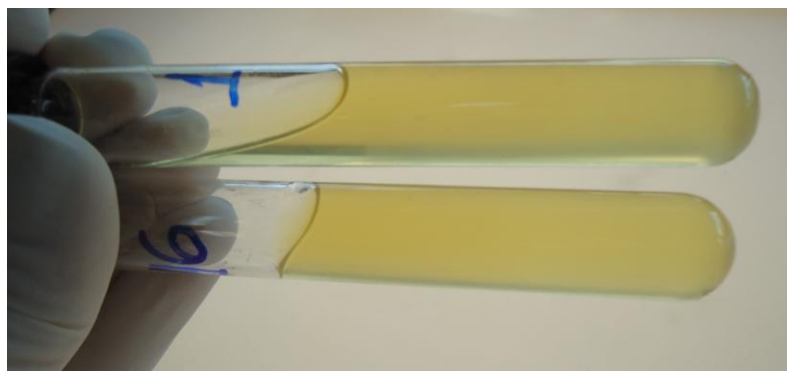


Figura 7. Teste da hidrólise da gelatinase. Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE P – TESTE DA HEMÓLISE (EXPRESSÃO DO GENE *cyIA*)

1. Princípios

A hemólise se refere à quebra dos eritrócitos, ou células vermelhas do sangue. As bactérias podem ser classificadas em α , β ou γ com base na sua habilidade de induzir a hemólise em ágar sangue.

2. Componentes

Placas de petri contendo BHI ágar com a adição de 5% de sangue de carneiro desfibrinado (BHI ágar sangue).

3. Procedimentos

Plaquear as colônias em BHI ágar sangue com o auxílio de uma alça. Após, incubar as placas contendo as colônias em ambiente microaerofílico a 37°C por 24 h. Método descrito por Coque et al. (1995).

4. Interpretação dos Resultados

- α hemólise – lise parcial dos eritrócitos (cor esverdeada).
- β hemólise – lise total dos eritrócitos (cor transparente).
- γ hemólise – não ocorre hemólise.

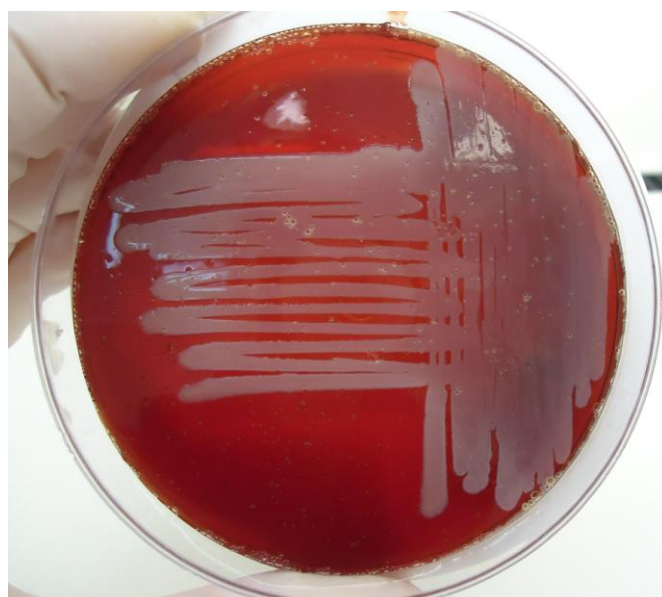


Figura 8. Teste da hemólise. Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE Q – PRODUÇÃO DE BIOFILME (EXPRESSÃO DO GENE *efaA*)

Método para a produção de biofilme, foi adaptado do proposto por Kafil et al. (2015).

Cepas de *E. faecalis* foram suspensas em BHI caldo para 0,5 McFarland. Placas de 96 poços foram preenchidas com 180 µl de TSB (Trypticase soy broth - Merck KGaA, Darmstadt, Germany) suplementado com 5% de glicose e 20 µl do inoculo (0,5 McFarland: OD 625: 0,08 e 0,1). O experimento foi realizado em triplicata, cada isolado foi colocado em 3 poços e incubados a 37°C por 24 h. Poços com TSB somente foram os controles negativos. Após a incubação, os poços foram lavados 3X com 150 µl de PBS estéril (phosphate buffered saline - Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Após, o PBS foi removido e os biofilmes foram fixados usando 150 µl de metanol por 20 min a uma temperatura de -20°C. A placa foi invertida numa toalha de papel durante 30 min à temperatura ambiente. Os biofilmes foram corados com 150 µl de solução violeta de cristal (2%) durante 15 min à temperatura ambiente e os poços foram lavados em água corrente. A placa foi invertida numa toalha de papel à temperatura ambiente. A produção de biofilme foi avaliada por densidade óptica do cristal de violeta ressolubilizado usando um leitor de placas (Thermo Fischer Scientific Inc, Waltham, MA, EUA) a 570 nm (OD570). Para isso, previamente foram adicionados 150 µl de 33% de ácido acetado (Synth, Diadema, SP, Brasil) durante 30 min sem agitação.

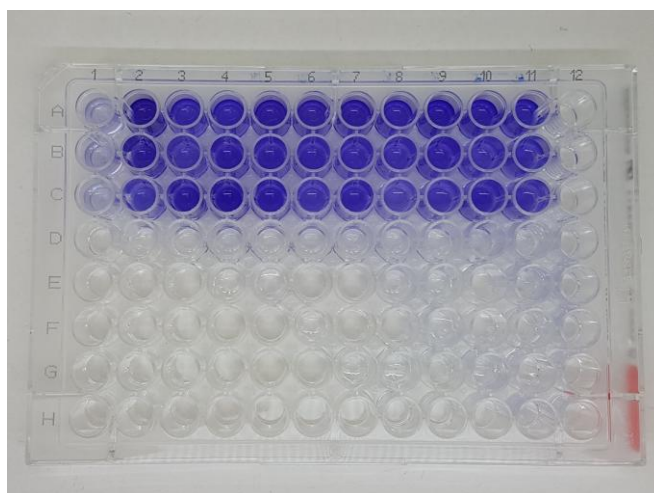


Figura 9. Produção de Biofilme. Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE R – PROPOSTAS DE TEXTOS INFORMATIVOS

Pauline Mastella Lang – Estudante de Pós-graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Daniel Marconi – Estudante de Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

Maria Beatriz Cardoso Ferreira – Professora Titular, Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Francisco Montagner – Professor Adjunto, Área de Endodontia, Departamento de Odontologia Conservadora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Orientações de uso de agentes antimicrobianos em infecções endodônticas agudas – proposta de difusão de conhecimentos para qualificar a assistência em saúde bucal

Orientações ao profissional

As infecções endodônticas agudas primárias são infecções polimicrobianas (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2013), nas quais há o predomínio de bactérias anaeróbias estritas (SIQUEIRA JR., RÔÇAS, 2009). A periodontite apical aguda (PAA) e o abscesso apical agudo (AAA) são manifestações típicas da infecção endodôntica aguda, sendo que a PAA precede o AAA (SIQUEIRA JR., RÔÇAS, 2009).

O tratamento local da PAA e do AAA envolve a drenagem (via canal ou cirúrgica) quando possível e tratamento endodôntico ou exodontia (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2013).

Quando devemos prescrever antibióticos?

A prescrição de antibióticos é indicada como terapia coadjuvante ao tratamento endodôntico somente nos casos de AAA em que os pacientes apresentam sintomatologia dolorosa associada a edema progressivo, difuso e sinais sistêmicos de infecção como febre, mal-estar e linfadenopatia; ou em pacientes que apresentam maior risco de infecção secundária resultante de bacteremia (SIQUEIRA & RÔÇAS, 2013).

Qual a importância do uso racional de antibióticos?

O uso racional de antibióticos tem como objetivo evitar a ocorrência de resistência bacteriana aos antibióticos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO) houve um aumento da resistência bacteriana aos antibióticos tanto na medicina, como na odontologia nos últimos anos (WHO, 2014). Entre as possíveis razões para o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos estão prescrições inapropriadas, uso inadequado pelos pacientes, diagnósticos limitados, venda não autorizada, falta de mecanismos adequados para regulamentação de medicamentos em utilização, e uso em não humanos (DE PAULA et al., 2014; MARRA et al., 2015; AYUKEKBONG; NTEMGWA; ATABE, 2017).

Como as bactérias tornam-se resistente aos antibióticos?

A resistência bacteriana aos antibióticos pode ocorrer de forma natural (intrínseca) ou de forma adquirida. A resistência natural é aquela inerente à célula bacteriana, determinada pela dificuldade do fármaco ultrapassar as superfícies externas das células bacterianas e ligar-se ao seu sítio de ação. Já a resistência adquirida, resulta quando cepas originalmente sensíveis tornam-se resistentes devido a uma alteração genética determinada por mutações ou aquisição de plasmídios (SILVA, 2002).

Quais antibióticos devem ser prescritos?

De acordo com Flynn (2011) e com a Sociedade Europeia de Endodontia (European Society of Endodontology – ESE, 2017), os antibióticos β -lactâmicos (Penicilina V e amoxicilina) são os fármacos indicados para o tratamento coadjuvante de infecções endodônticas agudas. Isso ocorre em virtude do seu amplo espectro diante de uma infecção polimicrobiana (SIQUEIRA JR; RÔÇAS, 2013), devido a sua baixa toxicidade para eucariotes (GEORGOPAPADAKOU, 1993), por apresentar um excelente perfil de segurança e baixo custo quando comparado a outros antibióticos (FLYNN, 2011).

Em casos de falha no tratamento com amoxicilina, recomenda-se a sua associação com ácido clavulânico (FLYNN, 2011; ESE, 2017). E em situações nas quais se observa alergia à penicilina, a clindamicina passa a ser o antibiótico de escolha (FLYNN, 2011, ESE, 2017). A ESE (2017) também recomenda em casos de alergia a penicilina, o uso de claritromicina ou azitromicina.

Tabela 1. Tipo, dosagem e duração de antibióticos prescritos em Endodontia de acordo com ESE (2017).

Antibiótico de escolha	Dose inicial	Dose de manutenção	Duração
Penicilina V	1000 mg	500 mg 4/4 horas 500 mg 8/8 horas	3 a 7 dias
Amoxicilina	1000 mg	500 mg 8/8 horas 875 mg 12/12 horas	3 a 7 dias
Amoxicilina + ácido clavulânico	1000 mg	500 mg 8/8 horas 875 mg 12/12 horas	3 a 7 dias
Clindamicina	600 mg	300 mg 6/6 horas	3 a 7 dias
Claritromicina	500 mg	250 mg 12/12 horas	3 a 7 dias
Azitromicina	500 mg	250 mg 24/24 horas	3 a 7 dias

Como o cirurgião-dentista pode contribuir para o uso correto dos antibióticos sistêmicos??

O profissional pode contribuir para que não haja um aumento na resistência bacteriana aos antibióticos sistêmicos comumente prescritos utilizando as seguintes abordagens:

- Educação continuada – é de suma importância que o cirurgião-dentista mantenha-se atualizado em relação ao tema, seja por meio da leitura de artigos científicos, ou frequentando congressos que abordem o assunto.
- Diagnóstico preciso – o profissional deve ser capaz de realizar um correto diagnóstico, e lembrar que em casos de pulpite irreversível, necrose pulpar, periodontite apical aguda, abscesso crônico e abscesso apical agudo sem envolvimento sistêmico a terapia antibiótica é contraindicada.
- Prescrição baseada em evidências científicas – o cirurgião-dentista deve conhecer os principais microrganismos que compõem a infecção e prescrever somente os antibióticos indicados para aquele tipo de infecção.
- Tratamento local – o profissional deve realizar o tratamento local para o combate da infecção, e lembrar que a terapia antibiótica sistêmica é apenas coadjuvante.
- Orientação ao paciente – o cirurgião-dentista deve orientar o paciente em relação ao uso do medicamento, ou seja, alertar o paciente que a medicação deve ser utilizada nas doses e nos intervalos recomendados. Além disso, o profissional deve salientar a importância de não interromper o tratamento, a fim de evitar que bactérias mais resistentes retornem ao organismo e agravem a situação.
- Orientação ao paciente – o cirurgião-dentista deve orientar o paciente em relação ao uso do medicamento, ou seja, alertar o paciente que a medicação deve ser utilizada nas doses e nos intervalos recomendados. Além disso, o profissional deve salientar a importância de não interromper o tratamento, a fim de evitar que bactérias mais resistentes retornem ao organismo e agravem a situação.

Pauline Mastella Lang – Estudante de Pós-graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Daniel Marconi – Estudante de Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil

Maria Beatriz Cardoso Ferreira – Professora Titular, Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Francisco Montagner – Professor Adjunto, Área de Endodontia, Departamento de Odontologia Conservadora, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Orientações de uso de agentes antimicrobianos em infecções endodônticas agudas – proposta de difusão de conhecimentos para qualificar a assistência em saúde bucal



Orientações ao paciente

Antibióticos são os medicamentos empregados para combater processos infecciosos causados por bactérias, e deve ser utilizado por você somente com receita, do médico ou do dentista.

Como você deve utilizar?

Os antibióticos devem ser utilizados nas doses e nos intervalos recomendados pelo profissional que o prescreve. Por exemplo, você recebeu a seguinte prescrição de antibiótico:

Consultório Odontológico Cirurgião Dentista CRO	
Fulano de Tal Via Oral Amoxicilina 500mg - 21 comprimidos Tomar 1 comprimido de 8 em 8 horas por 7 dias	
Cirurgião Dentista Data	
Endereço do consultório Telefone do consultório	

Figura 1. Modelo de prescrição de antibiótico.

Então, você deverá utilizar comprimidos com dose de 500 mg em intervalos de 8 horas durante 7 dias. Se você utilizar uma dose maior do que a recomendada, você pode ter uma intoxicação. Se você utilizar uma dose menor, pode haver agravamento dos sintomas da doença. O mesmo ocorre quando o medicamento é ingerido antes do horário, ou **quando** você esquece. Por isso, é importante que os intervalos sejam adequados a sua rotina. Lembre-se que a figura acima é apenas um exemplo.

O que você deve fazer caso esqueça o horário?

Caso você esqueça de usar o antibiótico no horário proposto pelo profissional, ao lembrar você deve utilizá-lo. Assim, você conseguirá que o antibiótico ainda seja eficaz contra as bactérias responsáveis pela infecção.

Por que você não deve interromper o tratamento?

Porque ao interromper o tratamento você contribui para a seleção de bactérias mais fortes, as chamadas BACTÉRIAS RESISTENTES. Essas bactérias resistem à ação do antibiótico, fazendo com que este perca o seu efeito.

Como você deve proceder em caso de alergia ao medicamento?

Se você notar algum desconforto durante o uso do antibiótico prescrito, você deve entrar em contato com o profissional que fez a prescrição **IMEDIATAMENTE**, para que ele substitua o antibiótico e faça as recomendações que julgar necessárias.

Por que você não deve utilizar antibióticos sem realizar consulta prévia?

Porque existem antibióticos específicos para cada tipo de infecção. Ao realizar uma consulta prévia, o profissional fará o diagnóstico, e indicará o antibiótico adequado para combater o micro-organismo responsável pela doença.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO INTERNATIONAL JOURNAL ANTIMICROBIALS AGENTS

International Journal of Antimicrobial Agents 48 (2016) 467–474



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Antimicrobial Agents

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijantimicag



International Society of Chemotherapy
for Infection and Cancer

Review

Resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections: systematic review and meta-analysis

Pauline M. Lang ^a, Rogério C. Jacinto ^b, Tatiane S. Dal Pizzol ^c, Maria Beatriz C. Ferreira ^d, Francisco Montagner ^{e,*}

^a Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Endodontic Division, Department of Restorative Dentistry, Univ. Estadual Paulista, Araçatuba, SP, Brazil

^c Post-Graduation Program in Epidemiology, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

^d Department of Pharmacology, Institute of Health Basic Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^e Endodontic Division, Department of Conservative Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2492 Bairro Santana, 90035-003 Porto Alegre, RS, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 March 2016

Accepted 8 August 2016

Keywords:

Antimicrobial agent

Susceptibility

Acute endodontic infection

Periapical abscess

Meta-analysis

ABSTRACT

Infected root canal or acute apical abscess exudates can harbour several species, including *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Streptococcus*, *Treponema*, *Olsenella* and not-yet cultivable species. A systematic review and meta-analysis was performed to assess resistance rates to antimicrobial agents in clinical studies that isolated bacteria from acute endodontic infections. Electronic databases and the grey literature were searched up to May 2015. Clinical studies in humans evaluating the antimicrobial resistance of primary acute endodontic infection isolates were included. PRISMA guidelines were followed. A random-effect meta-analysis was employed. The outcome was described as the pooled resistance rates for each antimicrobial agent. Heterogeneity and sensitivity analyses were performed. Subgroup analyses were conducted based upon report or not of the use of antibiotics prior to sampling as an exclusion factor (subgroups A and B, respectively). Data from seven studies were extracted. Resistance rates for 15 different antimicrobial agents were evaluated (range, 3.5–40.0%). Lower resistance rates were observed for amoxicillin/clavulanic acid and amoxicillin; higher resistance rates were detected for tetracycline. Resistance rates varied according to previous use of an antimicrobial agent as demonstrated by the subgroup analyses. Heterogeneity was observed for the resistance profiles of penicillin G in subgroup A and for amoxicillin, clindamycin, metronidazole and tetracycline in subgroup B. Sensitivity analyses demonstrated that resistance rates changed for metronidazole, clindamycin, tetracycline and amoxicillin. These findings suggest that clinical isolates had low resistance to β -lactams. Further well-designed studies are needed to clarify whether the differences in susceptibility among the antimicrobial agents may influence clinical responses to treatment.

© 2016 Elsevier B.V. and International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Endodontic infections occur due to caries or dental trauma when opportunistic bacterial pathogens gain access to the necrotic dental pulp or periapical tissues [1,2]. The infected root canal or acute apical abscess can harbour several species, including species belonging to the genera *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Streptococcus*, *Treponema* and *Olsenella* spp. as well as not-yet cultivable species [3,4]. Despite the broad range of species that have been isolated in acute endodontic infections, the microbial profiles

in these communities show few shared species and a great diversity among subjects [5]. Only the strict anaerobes *Olsenella profusa* and the taxon *Dialister* E1 were detected in all of the samples analysed by Jacinto et al [6] and Munson et al [7], respectively. However, *Tannerella forsythia*, *Shuttleworthia saeletes* and *Filifactor alocis* were only detected in one sample [6]. Interactions among biofilm community members are responsible for the presence of painful symptomatology [8,9]. Clinical signs and symptoms have been associated with specific bacterial species: pain with *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia/nigrescens* and *Eubacterium* spp.; tenderness to percussion with *Porphyromonas*, *Peptostreptococcus* and *Fusobacterium* spp.; and swelling with *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas* and *Fusobacterium* spp [3].

Clinical management of an acute endodontic infection involves root canal debridement and local drainage, whenever possible. In specific situations, antibiotics may be prescribed as a complementary

* Corresponding author. Endodontic Division, Department of Conservative Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos, 2492 Bairro Santana, 90035-003 Porto Alegre, Brazil. Fax: +555 133085002.

E-mail address: francisco.montagner@ufrgs.br (F. Montagner).

measure, especially for abscesses that are associated with systemic involvement, including fever, malaise and lymphadenopathy; disseminating infections resulting in cellulitis, progressive diffuse swelling and/or trismus; and abscesses in systemically compromised patients who are at an increased risk of a secondary infection following bacteraemia [2]. The choice of antibiotic is usually based upon previously published susceptibility, testing and clinical trials [1]. The β -lactam antibiotics, especially penicillin, have been recommended as being the first-line antibiotics because they work well against most causative bacteria and because penicillin has a low incidence of side effects [10,11]. Clindamycin has often been recommended in cases of allergy to penicillin or when penicillin has not been effective [10–12]. In the latter clinical situation, β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid in a combination with amoxicillin have also been indicated to extend the spectrum of coverage [10,11].

The emergence of antibiotic-resistant bacterial strains has increased, especially due to excessive and incorrect use of these particular agents [13]. Gomes et al reported an increase in resistance among anaerobic bacteria isolated from primary endodontic infections over a 9-year period in a Brazilian population [14]. Rational prescription of antimicrobial agents must be based on the resistance patterns of the micro-organisms, the characteristics of the patient (immunosuppression, previously reported allergy) and the drug's characteristics (cost, effectiveness, adverse effects). From a microbiological viewpoint, it requires a comprehensive analysis of the resistance profiles among microbial isolates from endodontic infections. Recently, Moraes et al performed a systematic review to describe the presence of resistance genes to antimicrobial agents in oral environments such as saliva, dental biofilm and endodontic infections [15]. However, there is a lack of information regarding whether the microbial isolates from endodontic infections expressing these virulence factors are conveyed as resistance to antimicrobial agents.

Therefore, the aim of this systematic review and meta-analysis was to depict the antimicrobial resistance profiles of bacterial isolates from primary acute endodontic infections as reported in the current literature.

2. Materials and methods

2.1. Focused patient, intervention, comparison and outcome (PICO) question

A systematic review was performed using the checklist items reported by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) [16]. The following focused question was developed in accordance with the recognised PICO format: 'What are the resistance rates to antimicrobial agents in studies that have isolated bacteria from those patients with acute endodontic infections?'

2.2. Eligibility criteria

Clinical studies evaluating the antimicrobial resistance of bacterial isolates in primary acute endodontic infections in humans by disk diffusion or Etest (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) methods were included in the survey.

2.3. Search strategy and information sources

Electronic searches were performed in PubMed, the Cochrane Library (all results), ISI Web of Knowledge, Scopus, LILACS, OpenGrey, SciELO, the CAPES database, the Grey Literature Report, Curtin University, GreyNet International and the Grey Literature Dentistry Database. Hand-searching was independently and extensively

```
((("dental pulp cavity"[MeSH Terms] OR ("dental"[All Fields] AND "pulp"[All Fields] AND "cavity"[All Fields]) OR "dental pulp cavity"[All Fields] OR ("root"[All Fields] AND "canal"[All Fields]) OR "root canal"[All Fields]) OR ("periapical abscess"[MeSH Terms] OR ("periapical"[All Fields] AND "abscess"[All Fields]) OR "periapical abscess"[All Fields])) AND ("microbial sensitivity tests"[MeSH Terms] OR ("microbial"[All Fields] AND "sensitivity"[All Fields] AND "tests"[All Fields]) OR "microbial sensitivity tests"[All Fields]) OR ("microbial"[All Fields] AND "sensitivity"[All Fields] AND "test"[All Fields]) OR "microbial sensitivity test"[All Fields]) AND "humans"[MeSH Terms])
```

Fig. 1. Search strategy adopted for the study, presenting the MeSH keywords and search terms for antimicrobial activity and the resistance of bacterial isolates from acute endodontic infections, as performed in the PubMed database and adapted for other databases.

performed by two authors (PML and FM) of the reference sections of the selected studies and the available systematic reviews. No language restriction was applied to the search, except for ISI Web of Knowledge. The search comprised those articles published from the inception of the database up to May 2015. Fig. 1 describes the search strategies that were adopted in the study for the PubMed database. This strategy was also employed and adapted for the other databases.

The following limits were used for the ISI Web of Knowledge database: Database (Web of Science™ Core Collection, Biological Abstracts® and the SciELO Citation Index); Areas of Research (Dentistry and Oral Surgery Medicine, Infectious Diseases, Pharmacology Pharmacy, Microbiology); Document Type (article); and Language (English, Portuguese and Spanish).

2.4. Study selection and data collection processes

Following title review and abstract selection, full-text articles were revised based upon the following inclusion criteria: clinical studies in humans that evaluated the antimicrobial resistance of bacterial isolates in primary acute endodontic infections by disk diffusion or Etest methods. Exclusion criteria comprised: (i) studies that did not specify the cause of the odontogenic abscess or the odontogenic infection (whether endodontic or not) or that did not specify the microbial susceptibility results for each source of infection; (ii) studies that did not specify whether the endodontic infection was acute or chronic; and (iii) studies that did not report the method used to evaluate antimicrobial resistance or if another method was used. After reading the included articles, an independent manual search was performed by two of the authors (PML and FM) in the reference section and for the authors of the selected articles.

Data regarding the research group, number of subjects included in the study, description of the recruitment, antibiotic exposure as an exclusion criteria, sample size, methods for sample size determination, conflicts of interest, microbial source/sampling, methods used to measure outcomes, antimicrobial agents tested, statistical analysis, number of bacterial strains and number of resistant strains were collected from all of the studies.

The overall percentage resistance to a specific antimicrobial agent was calculated for each study, regardless of the bacterial species tested. The overall percentage resistance for each tested antimicrobial agent was the average between the total number of resistant strains and the total number of tested strains. Strains that had an intermediate profile were considered susceptible to the antimicrobial agent. According to the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) [17], the 'intermediate' category included isolates with minimum inhibitory concentrations (MICs) of an antimicrobial agent that approach usually attainable blood and tissue levels and for which response rates may be lower than that

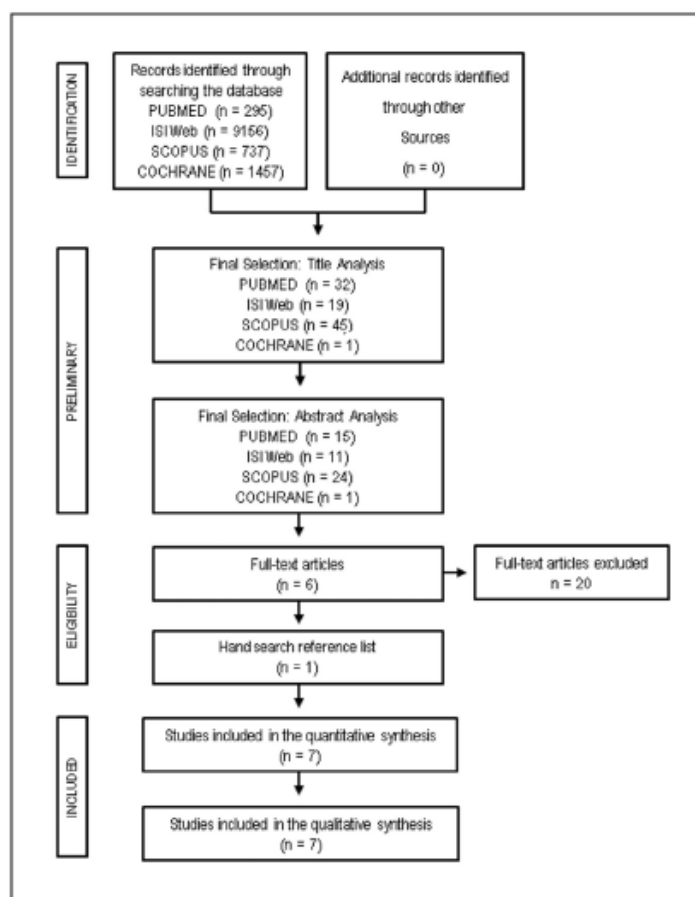


Fig. 2. Flow diagram of the search strategy developed to identify studies related to the antimicrobial resistance of bacterial isolates from acute endodontic infections.

of susceptible isolates. It implies clinical efficacy in body sites where the drug is physiologically concentrated or when a higher than normal dosage of a drug is used. It also includes a buffer zone, which would have prevented small, uncontrolled, technical factors from causing major discrepancies in the interpretations, especially for those drugs with narrow pharmacotoxicity margins.

2.5. Statistical methods for the meta-analysis

Statistical analysis was performed to evaluate the resistance profiles of the clinical isolates from primary acute endodontic infections to the antimicrobial agents using Comprehensive Meta-Analysis software v.3.3.070 (Biostat, Englewood, NJ).

A random-effect meta-analysis model was used to estimate the combined effect. The outcome was described as the pooled resistance rates for each antimicrobial agent and was shown using a Forest plot. The degree of heterogeneity was analysed by χ^2 test and the I^2 statistic, including all of the selected studies for the meta-analysis. A sensitivity analysis was performed by removing those studies with the greatest sample size [18,19] to evaluate the robustness of the results. A subgroup analysis was performed based

on the report or not of the use of antibiotics prior to collection as an exclusion factor in the original study. Subgroup A comprised studies that reported the previous use of antimicrobial agents as an exclusion factor [20,21], and Subgroup B included those studies that did not report the previous use of an antimicrobial agent as an exclusion factor [12,18,19,22,23].

3. Results

The results of the search strategy are presented in Fig. 2. The final results of the search in The Cochrane Library, ISI Web of Knowledge, Medline database (via PubMed) and Scopus yielded 1, 11, 15 and 24 publications, respectively. Several studies were shared in more than one database (Medline vs. ISI Web of Knowledge, 6; Medline vs. Scopus, 15; and Scopus vs. ISI Web of Knowledge, 9). Implementing the inclusion and exclusion criteria, 6 studies were included and 20 studies were excluded. One additional study was considered relevant by hand-searching.

Information about the selected studies is shown in Tables 1–4. The studies were performed over different time periods (2002–2014) and the samples were collected in Japan, the USA, Brazil and

Table 1
Study aims and characteristics of the samples in the included studies.

Author, year	Aims	Participants	Antibiotic exposure as exclusion criterion	Sample size ^a
Khemaleelakul et al, 2002 [22]	To determine the bacterial composition of the microbiota from acute endodontic abscesses/cellulitis; to determine the antimicrobial susceptibility of bacteria by Etest	17 patients (age 6–45 years)	No	118
Jacinto et al, 2003 [23]	To investigate the correlation between the composition of bacterial flora isolated from infected root canals of teeth with apical periodontitis and with the presence of clinical signs and symptoms; to test the antibiotic susceptibility of five anaerobic bacteria most commonly found in the root canals of symptomatic teeth	48 patients (age 13–63 years)	No	66
Kuriyama et al, 2005 [18]	To determine whether treatment of dentoalveolar infection was influenced by the choice of antibiotic and the presence of penicillin-resistant bacteria; to determine any correlation between the presence of antibiotic resistance within the infection and a history of previous antibiotic therapy	112 patients (age 17–81 years)	No	410
Ozbek et al, 2006 [21]	To identify micro-organisms in root canals with periapical abscesses and their antimicrobial susceptibility profiles and to revise the antimicrobial treatment protocols	30 patients: 14 males (mean age 31.8 years) 16 females (mean age 33.8 years)	Yes (3 months)	156
Skucaite et al, 2010 [12]	To evaluate the susceptibilities of endodontic pathogens isolated from teeth with symptomatic apical periodontitis to the most commonly prescribed antibiotics	58 patients (age 20–73 years)	No	66
Poeschl et al, 2011 [19]	To evaluate the actual bacterial resistance rates against the most commonly used antibiotics and to assess the clinical impact of the findings	89 patients (age 8–85 years)	No	122
Montagner et al, 2014 [20]	To detect the <i>ctxA/ctxA2</i> gene through molecular methods and to observe its expression through the MIC and the degradation of a lactamase substrate	20 patients (average age not mentioned)	Yes (3 months)	29

MIC, minimum inhibitory concentration.

^a Number of bacterial strains tested for antimicrobial susceptibility.

European countries. No selected study mentioned having conducted a sample size calculation; no study described how recruitment was conducted. Two selected papers reported no conflicts of interest [19,20]. Samples were collected from the root canals (symptomatic) and apical swellings. The vast majority of studies had not adopted previous exposure to antimicrobial agents as an exclusion criterion. Descriptive statistics were reported in all publications.

Data from seven studies were extracted [12,18–23]. A total of 15 different antimicrobial agents were evaluated in the selected studies, as follows: penicillin; amoxicillin; amoxicillin/clavulanic acid (AMC); ampicillin; piperacillin/tazobactam (TZP); clindamycin; metronidazole; erythromycin; azithromycin; cefaclor; cefazolin; ceftioxin; vancomycin; imipenem; and tetracycline. Results of the meta-analysis are shown in Fig. 3. The data are summarised in Table 5.

The overall resistance rates ranged from 3.5% to 40.0% for micro-organisms isolated from acute endodontic infections (Table 5). After the sensitivity analysis excluding the study of Kuriyama et al [18], the overall resistance rates were 9.5%, 23.2%, 25.4% and 64% of isolates for metronidazole, erythromycin, clindamycin and tetracycline,

respectively. After the sensitivity analysis excluding the study of Poeschel et al [19], the overall resistance rates were 4.9%, 4.3% and 12.9% of isolates to amoxicillin, AMC and penicillin G, respectively.

Subgroup analysis showed that the resistance rates ranged from 6.9% to 82.9% for studies that reported previous use of antimicrobial agents as an exclusion factor in the original study. However, they ranged from 1.4% to 21.7% for studies that did not report or did not employ previous use of antimicrobial agents as an exclusion factor.

The study observed heterogeneity in the resistance rates for penicillin G (Q-value = 9.479; P = 0.002) among the studies that reported previous use of antimicrobial agents as an exclusion factor (subgroup A). The same behaviour was not observed for AMC (Q-value = 3.011; P = 0.083). In subgroup A, heterogeneity analysis was not performed for clindamycin, erythromycin, metronidazole, tetracycline and amoxicillin because only one study included them (Fig. 3A). Heterogeneity was also observed for amoxicillin (Q-value = 9.809; P = 0.02), clindamycin (Q-value = 43.906; P = 0.000), metronidazole (Q-value = 15.536; P = 0.001) and tetracycline (Q-value = 33.7; P = 0.000) among those studies that had not reported the previous use of antimicrobial agents as being an exclusion factor

Table 2
Other information in the included studies.

Author, year	Microbial source/sampling	Method used to measure outcome	Antimicrobial agents
Khemaleelakul et al, 2002 [22]	Tissue swelling/ aspiration	Etest	Penicillin; amoxicillin; amoxicillin/clavulanic acid; clindamycin; metronidazole
Jacinto et al, 2003 [23]	Root canal/ paper points	Etest	Penicillin; amoxicillin; amoxicillin/clavulanic acid; clindamycin; metronidazole; erythromycin; cefaclor; azithromycin
Kuriyama et al, 2005 [18]	Root canal/ swab	Disk diffusion	Penicillin; clindamycin; metronidazole; erythromycin; tetracycline
Ozbek et al, 2006 [21]	Tissue swelling/ aspiration	Oxoid disks and Etest	Penicillin; amoxicillin/clavulanic acid; clindamycin; erythromycin; tetracycline; cefazolin; imipenem; metronidazole; ceftioxin; piperacillin/tazobactam
Skucaite et al, 2010 [12]	Root canal/ paper points	Etest	Penicillin; amoxicillin; amoxicillin/clavulanic acid; clindamycin; metronidazole; erythromycin; tetracycline; ampicillin; vancomycin
Poeschl et al, 2011 [19]	Tissue swelling/ aspiration	Disk diffusion	Penicillin; amoxicillin; amoxicillin/clavulanic acid; clindamycin; erythromycin
Montagner et al, 2014 [20]	Root canal/ paper points	Etest, Nitrocefin test	Penicillin; amoxicillin; amoxicillin/clavulanic acid

Table 3
Genera of tested bacteria that were reported in each included study.

Author, year	Bacterial genera
Khemaleelakul et al, 2002 [22]	<i>Bacteroides</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Acinomyces</i> , <i>Gemella</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Staphylococcus</i>
Jacinto et al, 2003 [23]	<i>Fusobacterium</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Gemella</i> , <i>Acinomyces</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Eggerthella</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Tissierella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Porphyromonas</i>
Kuriyama et al, 2005 [18]	<i>Prevotella</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Acinomyces</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Veillonella</i> , <i>Propionibacterium</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Capnocytophaga</i> , <i>Clostridium</i> , unspecified, strictly anaerobic Gram-negative bacillus, unidentified CO ₂ -dependent Gram-positive coccus
Ozbek et al, 2006 [21]	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Neisseria</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Acinomyces</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Mobiluncus</i> , <i>Erysipelothrix</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Porphyromonas</i>
Skucaite et al, 2010 [12]	<i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Anaerococcus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Tissierella</i> , <i>Eikenella</i>
Poeschl et al, 2011 [19]	<i>Streptococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Prevotella</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Bacteroides</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Eikenella</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>
Montagner et al, 2014 [20]	<i>Prevotella</i> , <i>Porphyromonas</i> , <i>Parvimonas</i>

Table 4
Number of resistant strains for each antibiotic in the included studies.

Author, year	No. of bacterial strains tested	No. of resistant strains														
		PCG	PCV	AMX	AMC	CLI	MTZ	ERY	TET	CEZ	CCL	AMP	VAN	IPM	CFX	TZP
Khemaleelakul et al, 2002 [22]	118	–	23	18	0	13	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	58	–	–	–	–	–	7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Jacinto et al, 2003 [23]	66	7	–	0	0	3	3	7	–	–	0	–	–	–	–	–
Kuriyama et al, 2005 [18]	410	–	53	–	–	13	82	96	36	–	–	–	–	–	–	–
Ozbek et al, 2006 [21] ^a	156	74	–	–	–	57	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	76	–	–	–	17	–	15	39	63	23	–	–	–	–	–	–
	70	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	3	14	7	
Skucaite et al, 2010 [12]	66	–	–	–	–	–	–	–	–	–	21	0	–	–	–	–
	65	1	–	–	–	14	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	53	–	–	0	–	–	–	15	21	–	–	–	–	–	–	–
	10	–	–	–	0	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	9	–	–	–	–	–	5	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Poeschl et al, 2011 [19]	122	–	–	11	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	107	–	–	–	–	23	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	103	10	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	76	–	–	–	–	–	–	17	–	–	–	–	–	–	–	–
Montagner et al, 2014 [20] ^a	29	4	–	2	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

PCG, penicillin G; PCV, penicillin V; AMX, amoxicillin; AMC, amoxicillin/clavulanic acid; CLI, clindamycin; MTZ, metronidazole; ERY, erythromycin; TET, tetracycline; CEZ, cefazolin; CCL, cefaclor; AMP, ampicillin; VAN, vancomycin; IPM, imipenem; CFX, cefoxitin; TZP, piperacillin/tazobactam.

–, not tested.

^a Original studies that reported prior use of antibiotics as an exclusion criterion.

(subgroup B). Penicillin G (Q-value = 3.519; $P = 0.172$), penicillin V (Q-value = 3.161; $P = 0.075$), AMC (Q-value = 1.683; $P = 0.641$) and erythromycin (Q-value = 6.204; $P = 0.102$) did not show heterogeneity among resistance rates in the articles belonging to subgroup B that did not report the previous use of antimicrobial agents as being an exclusion factor (Fig. 3B).

A random-effect meta-analysis model was not performed for cefaclor, tetracycline, cefazolin, ampicillin, azithromycin, vancomycin, imipenem, cefoxitin and TZP because they were mentioned in only a single study [21]. The resistance rates to these antimicrobial agents are shown in Table 4.

4. Discussion

In the present study, a comprehensive systematic review was conducted to identify, evaluate and synthesise all of the clinical studies that met the specified eligibility criteria in order to determine: 'What are the resistance rates to antimicrobial agents in studies that isolated bacteria from patients with primary acute endodontic infections?' Although the majority of clinical isolates have been found to be susceptible to the antimicrobial agents that are usually prescribed, there was a wide range of antibiotic resistance among them. The resistance rates varied according to the previous use of an antimicrobial agent.

The currently employed methods to determine the susceptibility profiles of clinical isolates are regulated by standard protocols that employ a cultivation-based approach [17,24]. Only articles that employed the disk diffusion and Etest methods were selected because they included patterns that allow for a comparison according to NCCLS and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) guidelines. Continuous monitoring of microbial susceptibility over time should be encouraged, but there are few reports in the current literature that describe the shift in antimicrobial resistance in bacteria isolated from endodontic infections [14]. There is a need for constantly revising the literature in order to obtain proper data that may guide and support the clinical choices of adjunctive systemic antimicrobial therapy. Use of statistical methods, as performed in the meta-analysis, may provide a quantitative synthesis of the data regarding the susceptibility rates of clinical isolates from patients with primary acute endodontic infections.

Despite the strict selection criteria, evaluation of the studies showed few factors that connected them. For example, several species were isolated and tested for their antimicrobial susceptibility. Furthermore, the included articles did not test the same set of antimicrobial agents for susceptibility of all of the isolates. The little amount of shared information in the studies did not allow for the determination through a meta-analysis of the resistance

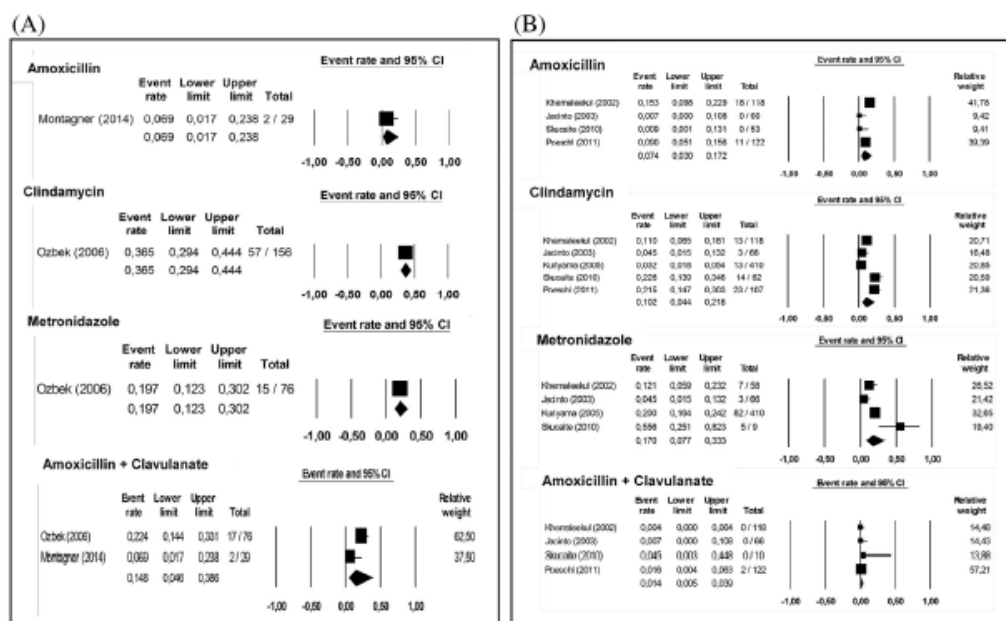


Fig. 3. (A) Forest plot for the antimicrobial resistance profiles of clinical isolates from primary acute endodontic infections for each antimicrobial agent, according to data from those studies that reported prior use of antibiotics as an exclusion factor. Heterogeneity test results: Penicillin G (Q-value = 9.479; $P = 0.002$); amoxicillin/clavulanic acid (AMC) (Q-value = 3.011; $P = 0.083$). (B) Forest plot for the antimicrobial resistance profiles of clinical isolates from primary acute endodontic infections for each antimicrobial agent, according to data from those studies that did not report prior use of antibiotics as an exclusion criterion. Heterogeneity test results: Amoxicillin (Q-value = 9.809; $P = 0.02$); penicillin G (Q-value = 3.519; $P = 0.172$); clindamycin (Q-value = 43.906; $P = 0.000$); penicillin V (Q-value = 3.161; $P = 0.075$); metronidazole (Q-value = 15.536; $P = 0.001$); erythromycin (Q-value = 6.204; $P = 0.102$); AMC (Q-value = 1.683; $P = 0.641$); tetracycline (Q-value = 33.7; $P = 0.000$). CI, confidence interval.

profiles for each species/genera. The overall resistance percentages for a specific antimicrobial agent were calculated for each study, regardless of the species that were tested.

For primary acute endodontic infections, the overall resistance rates varied according to the antimicrobial agent. The bacterial strains were highly susceptible to AMC and amoxicillin. Higher resistance rates were observed for tetracycline. Intermediate values were observed for penicillin G, clindamycin, penicillin V, metronidazole and erythromycin. The results were in accordance with clinical recommendations which suggest antibiotics of the β -lactam group, especially amoxicillin and AMC, as

being the first choice for the management of acute endodontic infections owing to their efficacy, safety, and convenience for administration and access [10,25,26]. The low susceptibility rates for tetracycline were probably associated with intrinsic resistance among the anaerobic strains as well as secondary resistance due to its broad use and misuse [27,28]. For the past two decades, the most commonly used antibiotics in periodontal treatment have been the tetracyclines [29,30]. The widespread emergence of tetracycline resistance in medically important bacteria has limited the use of tetracycline in the treatment of medical infections [31]. In the oral cavity, tetracycline resistance has increased over

Table 5
The pooled resistance rate, as determined by data extracted from the included studies.

Antibiotic	Overall data			Studies that reported previous use of ATBs as exclusion criterion (subgroup A) ^a			Studies that did not report/employ previous use of ATBs as exclusion criterion (subgroup B) ^a		
	%RES ^b	CI	n _{RES} /n ^c	%RES ^b	CI	n _{RES} /n ^c	%RES ^b	CI	n _{RES} /n ^c
AMC	3.5	0.8–14.2	21/421	14.8	4.6–38.6	19/105	1.4	0.5–3.9	2/316
Amoxicillin	7.7	3.6–15.5	31/388	6.9	1.7–23.8	2/29	7.4	4.0–17.2	29/359
Penicillin G	12.3	3.6–34.6	100/458	29.1	7.0–68.9	78/185	7.9	4.0–15.0	18/357
Clindamycin	13.1	5.6–27.5	123/919	36.5	29.4–44.4	57/156	10.2	4.4–21.8	66/756
Penicillin V	15.5	10.2–22.8	76/528	–	–	–	15.5	10.2–22.8	76/528
Metronidazole	17.5	10.5–27.9	112/619	19.7	12.3–30.2	15/76	17.0	7.7–33.3	97/543
Erythromycin	26.0	16.2–38.9	174/681	51.3	40.2–62.3	39/76	21.7	16.2–28.3	135/605
Tetracycline	40.0	6.2–87.0	120/539	82.9	72.7–89.8	63/76	19.9	3.6–61.9	57/463

ATB, antibiotics; CI, confidence interval; AMC, amoxicillin/clavulanic acid.

^a Subgroup A [20,21]; subgroup B [12,18,19,22,23].

^b %RES = percentage of resistant strains (pooled values).

^c n_{RES}/n, number of resistant strains/total number of strains.

the past several years [32]. Some investigators have reported that this may be one of the reasons for the reduced effects of tetracyclines as an adjuvant measure for the treatment of periodontitis [33–36].

Despite the differences in laboratorial susceptibility patterns observed for the antimicrobial agents, it was not possible to determine whether they influence clinical responses to treatment. It should be emphasised that acute endodontic infections are polymicrobial with very high interindividual variability.

The involvement of species in a mixed consortium promotes a broad range of relationships among them, modulating their pathogenicity as additive or synergistic pathogenic effects [2,4]. The control of endodontic infections does not have the species as a main target. Eradication of some components of the microbial community may lead to its disturbance and the remaining members may not be able to survive without cross-interactions [4]. The ecological interference that is promoted by the local approach (such as root canal treatment and surgical drainage) might overcome the resistance to antimicrobial agents as demonstrated by some of the community members and lead to death of the resistant strain. However, Flynn et al reported in a prospective study that penicillin treatment failure was not predicted by pre-admission, timing, anatomic or preoperative clinical variables in a sample of 37 subjects admitted for severe odontogenic infections [37]. The authors observed that 6 of 24 subjects had penicillin treatment failure, and penicillin-resistant bacteria were detected in all of the patients who had no response to the antimicrobial treatment. Therefore, further studies with large sample sizes should be conducted to determine the relationship between the presence of resistant strains and the outcomes of the proposed treatment.

Previous use of antimicrobial agents is a variable that must be considered in the data analysis. Skuicaite et al evaluated the susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis who had previous use of an antimicrobial agent [12]. According to the results, no correlation was found between microbial susceptibility to antibiotics and previous antibiotic intake. However, Kuriyama et al showed that penicillin-resistant bacteria were isolated more frequently from patients who had received penicillin before sampling [18]. There was no significant correlation between the prevalence of erythromycin-resistant bacteria and previous administration of erythromycin. Therefore, a subgroup analysis was performed regarding the results to determine the effects of previous use of antibiotics. It was observed that the resistance rates were different when comparing studies that reported previous use of antimicrobial agents as an exclusion criterion (subgroup A). Articles that did not report previous use of antimicrobial agents as an exclusion criterion comprised subgroup B. These differences could be related to diverse factors: the small number of studies; the reduced number of bacterial strains that were tested in each study; the fact that the resistance rates were obtained from a pool of bacteria; and the fact that the correlation between the prevalence of resistant bacteria and previous use of antibiotics appeared to occur for some agents, but not for others. In addition, there was a limitation of memory bias, since patients could not remember exactly what drugs they had used in the past 3 months. These results emphasise the need to analyse the data reported in articles and to consider the previous use or not of antibiotics, since the resistance rates differed between the subgroups. However, independent of the differences among the subgroups A and B and the overall data, the general profiles of resistance remained the same: lower rates of resistance for amoxicillin and AMC; higher rates of resistance for the tetracyclines; and intermediate rates for the other antimicrobial agents that were tested.

In parallel, a heterogeneity analysis was performed for specific antimicrobial agents, depending on the subgroup of the studies. There was heterogeneity among the resistance profiles for penicillin G for the studies that excluded previous use an antimicrobial

agent (subgroup A) and for amoxicillin, clindamycin, metronidazole and tetracycline among the studies that did not exclude this use (subgroup B). These findings can be associated with several bacterial species that were tested and for the different sites of sampling. Despite being concomitant infections, matched samples taken from the root canal and abscess aspirates from the same subject had discrepancies between the bacterial community profiles [5]. Furthermore, the microbial profiles of the acute endodontic infection samples were unique for each subject and did not show any clustering behaviour from the samples that were collected among patients [5,38]. Despite the assessment of a specific group of endodontic infections, the microbiome was modulated by its geographic location [39–41]. It was not possible to perform a region-based analysis because the samples were collected from six different countries (Thailand, Brazil, UK, Turkey, Lithuania and Austria). Only the results reported by Jacinto et al [23] and Montagner et al [20] belonged to the same geographic location (Brazil).

Sensitivity analyses were performed excluding those studies with the largest sample sizes [18,19] to evaluate whether the findings were dependent on arbitrary or unclear decisions. The overall resistance rates to erythromycin, AMC and penicillin G were similar when the studies were included in the meta-analysis. However, the overall resistance rates to metronidazole, clindamycin, tetracycline and amoxicillin were different when these studies were included in the meta-analysis. Although different, it was not possible to determine whether the difference influenced the clinical response to treatment, as discussed previously.

The results of this systematic review and meta-analysis are limited by several factors, as previously discussed. They are also associated with the limitations that were imposed by bacterial recovery from the complex microbial communities. It should be emphasised that available cultivation methods have not yet been able to allow for the laboratorial growth and isolation of several micro-organisms. Furthermore, the results obtained through susceptibility testing represented a single micro-organism or a select group of micro-organisms that were isolated from the infected site. The virulence of the strains might have been modulated by their isolation in the culture medium, especially due to the lack of interaction among the several micro-organisms that were also present in the odontogenic infection. There was also a lack of data on the specific number of strains that were tested for each sample in the articles. The tested isolates may or may not have represented all of the microbial community that was active in the infected site. As culturing and testing of slow-growing oral bacteria can take up to 2 weeks, therapeutic decisions still have to be based on previous reports from the literature, as has been summarised in the present study.

5. Conclusion

This systematic review and meta-analysis allowed for depicting the resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections. AMC and amoxicillin showed the lowest *in vitro* rates for bacterial resistance among the strains. The resistance rates for the antimicrobial agents varied according to the previous use of an antimicrobial agent. There was a lack of information regarding the association between the resistance profiles of the bacterial isolates and clinical outcomes.

Funding: None.

Competing interests: None declared.

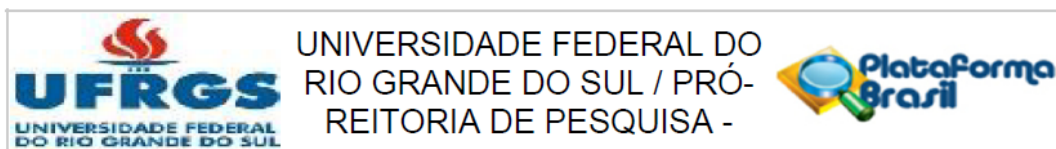
Ethical approval: Not required.

References

- [1] Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod* 2003;29:44–7.

- [2] Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev* 2013;26:255–73.
- [3] Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadêlma Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71–6.
- [4] Siqueira JF Jr, Rôças IN. The microbiota of acute apical abscesses. *J Dent Res* 2009;88:61–5.
- [5] Montagner F, Gomes BP, Kumar PS. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *J Endod* 2010;36:1475–9.
- [6] Jacinto RC, Gomes BP, Desai M, Rajendram D, Shah HN. Bacterial examination of endodontic infections by clonal analysis in concert with denaturing high-performance liquid chromatography. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:403–10.
- [7] Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 2002;81:761–6.
- [8] Siqueira JF Jr, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:363–70.
- [9] Sakamoto M, Rôças IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:112–22.
- [10] Oberoi SS, Dhingra C, Sharma G, Sardana D. Antibiotics in dental practice: how justified are we. *Int Dent J* 2015;65:4–10.
- [11] Holmes CJ, Pellicchia R. Antimicrobial therapy in management of odontogenic infections in general dentistry. *Dent Clin North Am* 2016;60:497–507.
- [12] Skuicaitė N, Peculienė V, Vičiūskienė A, Machiulskienė V. Susceptibility of endodontic pathogens to antibiotics in patients with symptomatic apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:1611–16.
- [13] Cantas I, Shah SQ, Cavaco LM, Manaiá CM, Walsh F, Popowska M, et al. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Front Microbiol* 2013;14:4–96.
- [14] Gomes BPFA, Jacinto RC, Montagner F, Souza ELR, Ferraz CCR. Analysis of the antimicrobial susceptibility of anaerobic bacteria isolated from endodontic infections in Brazil during a period of nine years. *J Endod* 2011;37:1058–62.
- [15] Moraes LC, Sô MVR, Dal Pizzol TS, Ferreira MBC, Montagner F. Distribution of genes related to antimicrobial resistance in different oral environments: a systematic review. *J Endod* 2015;41:434–41.
- [16] Moher D, Shamseer L, Clarke M, Ghersi D, Liberati A, Petticrew M, et al. PRISMA-P group. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. *Syst Rev* 2015;4:1.
- [17] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. 6th ed. Wayne, PA: NCCLS; 2004. Document M11-A6.
- [18] Kuriyama T, Absi EG, Williams DW, Lewis MAO. An outcome audit of the treatment of acute dentoalveolar infection: impact of penicillin resistance. *Br Dent J* 2005;198:759–63.
- [19] Poeschl PW, Crepaz V, Russmueller G, Seemann R, Hirschl AM, Ewers R. Endodontic pathogens causing deep neck space infections: clinical impact of different sampling techniques and antibiotic susceptibility. *J Endod* 2011;37:1201–5.
- [20] Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Mattos VS, Grecca FS, Gomes BPFA. β -Lactamic resistance profiles in *Porphyromonas*, *Prevotella*, and *Parvimonas* species isolated from acute endodontic infections. *J Endod* 2014;40:339–44.
- [21] Ozbek SM, Evcil MS, Ozbek A, Erdogan AS, Köseoglu M. Microbiological analysis of root canals associated with periapical abscesses (with pain and swelling) and the antimicrobial susceptibility of isolated bacteria. *Pain Clin* 2006;18:327–37.
- [22] Khemleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94:746–55.
- [23] Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:285–92.
- [24] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk diffusion test methodology (v.5.0, January 2015). http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/; 2015 [accessed 19.09.16].
- [25] Ellison SJ. The role of phenoxymethylpenicillin, amoxicillin, metronidazole and clindamycin in the management of acute dentoalveolar abscesses—a review. *Br Dent J* 2009;206:357–62.
- [26] Poveda Roda R, Bagan JV, Sanchis Bielsa JM, Carbonell Pastor E. Antibiotic use in dental practice. A review. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007;12:E186–92.
- [27] Rodrigues RM, Gonçalves C, Souto R, Feres-Filho EJ, Uzeda M, Colombo AP. Antibiotic resistance profile of the subgingival microbiota following systemic or local tetracycline therapy. *J Clin Periodontol* 2004;31:420–7.
- [28] Roberts MC. Tetracycline therapy: update. *Clin Infect Dis* 2003;36:462–7.
- [29] Van Winkelhoff AJ, Rams TE, Slots J. Systemic antibiotic therapy in periodontics. *Periodontol* 2000 1996;10:45–78.
- [30] Walker C, Karpinia K. Rationale for use of antibiotics in periodontics. *J Periodontol* 2002;73:1188–96.
- [31] Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer, and clinical significance. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:387–99.
- [32] Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. *Periodontol* 2000 1996;10:79–88.
- [33] Asikainen S, Jousimies-Somer H, Kanervo A, Saxén L. The immediate efficacy of adjunctive doxycycline in treatment of localized juvenile periodontitis. *Arch Oral Biol* 1990;35(Suppl.):2315–45.
- [34] Mombelli A, Tonetti M, Lehmann B, Lang NP. Topographic distribution of black-pigmenting anaerobes before and after periodontal treatment by local delivery of tetracycline. *J Clin Periodontol* 1996;23:906–13.
- [35] Colombo AP, Halfajee AD, Dewhurst FE, Paster BJ, Smith CM, Cuggini MA, et al. Clinical and microbiological features of refractory periodontitis subjects. *J Clin Periodontol* 1998;25:169–80.
- [36] Wong MY, Lu CL, Liu CM, Hou LT. Microbiological response of localized sites with recurrent periodontitis in maintenance patients treated with tetracycline fibers. *J Periodontol* 1999;70:861–8.
- [37] Flynn TR, Shanti RM, Hayes C. Severe odontogenic infections, part 2: prospective outcomes study. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:1104–13.
- [38] Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FGC, Sanches PF, Gomes BPFA. Clustering behavior in microbial communities from acute endodontic infections. *J Endod* 2012;38:158–62.
- [39] Rôças IN, Siqueira JF Jr, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult Norwegian patients. *J Endod* 2011;37:1206–12.
- [40] Machado de Oliveira JC, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Peixoto RS, et al. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:14–18.
- [41] Rôças IN, Baumgartner JC, Xia T, Siqueira JF Jr. Prevalence of selected bacterial named species and uncultivated phylogenies in endodontic abscesses from two geographic locations. *J Endod* 2006;32:1135–8.

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO, DIVERSIDADE GENOTÍPICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Streptococcus* spp. EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS AGUDAS - I

Pesquisador: FRANCISCO MONTAGNER

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46952315.1.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.183.734

Data da Relatoria: 09/07/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se projeto de tese de doutorado do PPG Odontologia UFRGS de Pauline Mastella Lang, caracteriza-se como estudo clínico-laboratorial.

O estudo será realizado no Plantão de Urgência da Faculdade de Odontologia da UFRGS e na Unidade de Pronto Atendimento do Grupo Hospitalar Conceição.

A amostra será constituída por 11 participantes, de acordo com o programa WinPepi (JH Abramson, 2010, Versão 10.5), adotando uma diferença aceitável de 25%, uma proporção assumida de 22% com base no estudo de Gomes et al.(2004) e intervalo de confiança de 95%.

Crítérios de inclusão:

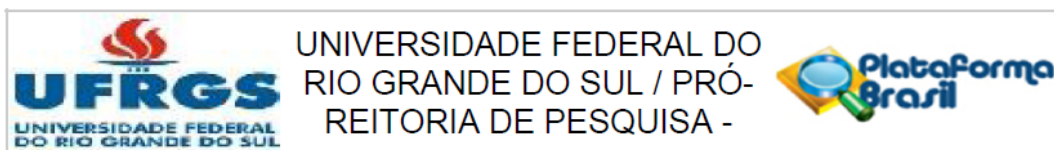
Maiores de 18 anos com diagnóstico de Periodontite Apical Aguda (PAA) e Abscesso Apical Agudo(AAA) de acordo com os critérios estabelecidos por Gutmann et al. (2009);

dente envolvido não recebeu tratamento endodôntico prévio; participante sem uso de antibióticos num período mínimo de 3 meses, para não interferir na microbiota do canal radicular; sem comprometimento sistêmico.

Crítério de exclusão:

Participantes cujo(s) dente(s) não possibilita a realização do isolamento absoluto do campo operatório; em que a anatomia do canal radicular impossibilite a introdução do cone de papel no

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.183.734

canal radicular até as proximidades do comprimento do dente na radiografia;
dente(s) possuem profundidade de sondagem maior que 4 milímetros (mm); com exposição direta da câmara pulpar e/ou canal radicular ao meio bucal.

Coleta: "microbiológicas do canal radicular serão realizadas nas Clínicas Odontológicas Integradas II e III da FO-UFRGS e na Unidade de Pronto Atendimento do Grupo Hospitalar Conceição". O processo de coleta está descrito em detalhes.

Análise de Dados: "dados coletados serão colocados em uma planilha de cálculo (Microsoft Office Excell 2007, Microsoft Corporation, Redmont, WA, EUA) e estatisticamente analisados utilizando-se o programa SPSS Statistics 18.0 Software (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). Para todos os testes estatísticos empregados, o nível de significância será estabelecido em 5%. Será realizada estatística descritiva apresentação dos dados como frequências absolutas e relativas, média e desvio-padrão ou mediana e percentis, conforme as características dos dados a serem obtidos, será delineada a análise estatística. A frequência da presença das espécies isoladas por meio do método de cultura microbiana e sequenciamento do gene 16S rRNA será determinada para as amostras dos canais radiculares com necrose pulpar e dor. Os microrganismos serão classificados em suscetíveis (S), intermediários (I) e resistentes (R) de acordo com a CIM do agente antimicrobiano testado para a cepa. Os índices de suscetibilidade serão determinados de acordo com as concentrações inibitórias mínimas reportadas por normas do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2014). Todos os testes que serão utilizados estão descritos em detalhes.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar o perfil de sensibilidade a agentes antimicrobianos de Streptococcus spp., isolados de canais radiculares em dentes com necrose pulpar e dor.

Objetivos Secundários:

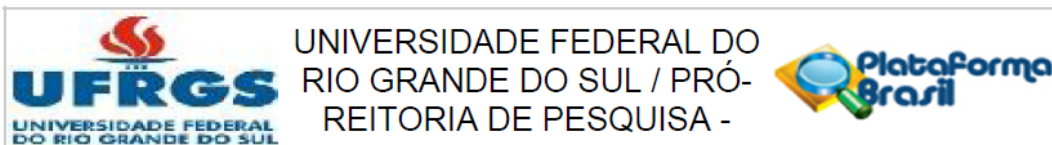
Identificar espécies de Streptococcus em canais radiculares de dentes portadores de necrose pulpar e dor pela associação dos métodos de cultura e sequenciamento do gene 16S rRNA;

Verificar o perfil de sensibilidade de Streptococcus spp. aos antibióticos -lactâmicos e clindamicina;

Comparar a eficácia dos agentes antimicrobianos frente a isolados de Streptococcus spp.;

Determinar a diversidade genética dos isolados de Streptococcus spp. em um mesmo canal radicular e diferentes canais radiculares;

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farrroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.183.734

Determinar a diversidade genética dos genes PBP 2B e PBP 2X em isolados de amostras de canais radiculares de dentes com necrose pulpar e dor;

Verificar a presença dos genes erm A e erm B em isolados de amostras de canais radiculares de dentes com necrose pulpar e dor;

Relacionar o perfil genético das cepas de Streptococcus spp. e a presença dos genes erm A e erm B com o perfil de sensibilidade à clindamicina;

Relacionar o perfil genético da cepa de Streptococcus spp. e dos genes PBP 2B e PBP 2X ao seu perfil de sensibilidade aos antibióticos -lactâmicos .

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os pesquisadores acrescentam que "os riscos ou desconfortos causados aos pacientes com a técnica da coleta de amostra com cone de papel absorvente estéril não são significativos. Se a manifestação dolorosa ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, o paciente poderá ser atendido no Plantão de Urgência da FO-UFRGS, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, das 8:30 às 11:30 horas e das 14:30 às 17:30 horas e poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis para receber uma assistência imediata por meio dos telefones: (51) 3308-5430 (Área de Endodontia da FO-UFRGS), ou ao Plantão de Urgência Odontológica da Unidade de Pronto Atendimento do Grupo Hospitalar Conceição que funciona 24 horas."

Em relação aos benefícios dizem que são indiretos "aos voluntários, pois estarão relacionados ao controle da sintomatologia dolorosa e a possibilidade de determinar a presença de microrganismos resistentes aos antimicrobianos prescritos em odontologia".

Entretanto o " monitorar periodicamente a resistência de microrganismos frente a agentes antimicrobianos, contribui para o estabelecimento de protocolos de atendimento de urgência que contemplem agentes antimicrobianos eficazes, mais seguros e acessíveis. Tal fato beneficia o GHC como instituição, os pacientes e a sociedade como um todo."

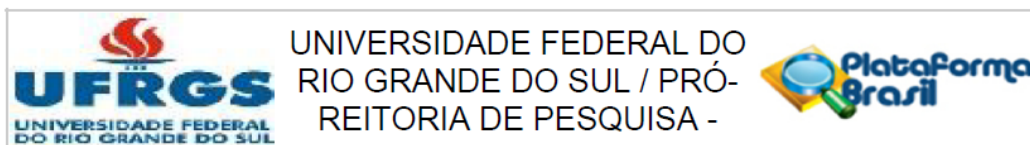
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto apresenta relevância científica e social e pertinência teórico metodológica.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido adequado, apresentando informações detalhadas da participação na pesquisa.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 1.183.734

Encontra-se anexado ao projeto o Termo de Anuência do responsável pela Unida de Pronto Atendimento- UPA Zona Norte do Grupo Hospitalar Conceição ;Carta resposta aos questionamentos do CEP-GHC; Termo de Compromisso para entrega de relatórios Semestral e final GHC; Relação dos participantes do projeto de pesquisa GHC; Termo de Anuência do Cirurgião Dentista UPA-GHC

Recomendações:

Projeto sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

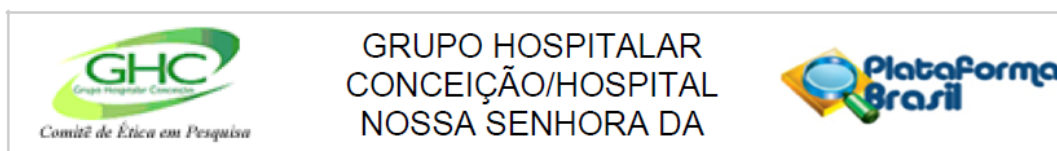
Aprovado.

PORTO ALEGRE, 13 de Agosto de 2015

Assinado por:
MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA
 (Coordenador)

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO C – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO, DIVERSIDADE GENOTÍPICA E PERFIL DE SENSIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE *Streptococcus* spp. EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS AGUDAS - I

Pesquisador: FRANCISCO MONTAGNER

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 46952315.1.3001.5530

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.201.885

Apresentação do Projeto:

Vide parecer anterior.

Objetivo da Pesquisa:

Vide parecer anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Adequados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

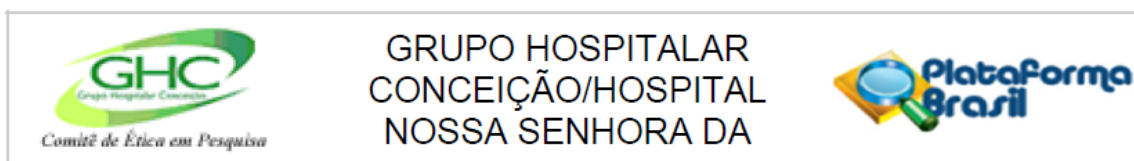
Pesquisadores apresentaram nova versão adequadas as realidades do GHC.

RESPOSTA AO PARECER:

QUESTÃO 1: Quem realizará a coleta na UPA-GHC? Como serão os fluxos? De que forma afetará a rotina do serviço?

RESPOSTA: Estas informações estão descritas na página 21 (linhas 10 a 13) e na página 52 (correspondente ao ANEXO 1). As coletas microbiológicas na Unidade de Pronto Atendimento do Grupo Hospitalar Conceição serão realizadas pelo cirurgião-dentista do GHC (Anexo 1). Conforme a declaração, os procedimentos clínicos descritos no projeto seguem as condutas adotadas para o atendimento de infecções endodônticas agudas UPA-GHC. Os cones de papel, gerados durante o

Endereço: Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2407 **Fax:** (51)3357-2407 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br



Continuação do Parecer: 1.201.885

atendimento de urgência e que seriam descartados, serão entregues para os pesquisadores.

QUESTÃO 2: Como e onde os pacientes terão seus canais tratados?

RESPOSTA: O tratamento que o paciente receberá consiste no tratamento endodôntico de urgência de rotina, motivo pelo qual o paciente procurou o serviço, conforme descrito na página 23 (linha 10). Os pacientes seguirão o fluxo de atendimento proposto pela Unidade de Pronto Atendimento do GHC.

QUESTÃO 3: Instrumento coleta dados identifica sujeitos;

RESPOSTA: Conforme solicitado, foi removido do instrumento de coleta de dados (Apêndice 2) o registro dos dados de identificação do paciente (página 57).

QUESTÃO 4: Como será o armazenamento do material biológico? A FOUFRGS tem Biobanco? Como serão cumpridas as exigências da Resolução CNS 441/11?

RESPOSTA: Foi realizada correção no projeto e as amostras serão descartadas após a realização do estudo (página 40, linha 24).

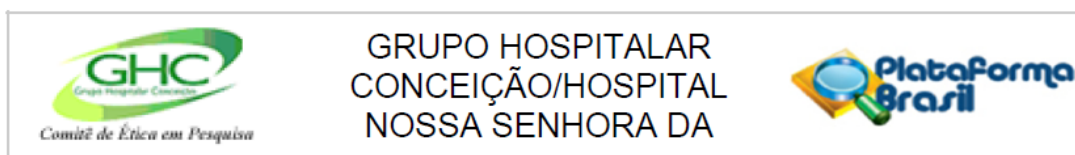
QUESTÃO 5: TCLE: não traz os benefícios do estudo aos sujeitos envolvidos e nem tempo total dos procedimentos.

RESPOSTA: Foram incluídos no TCLE os benefícios do estudo aos sujeitos envolvidos. Os benefícios esperados afetam indiretamente os voluntários, pois estarão relacionados ao controle da sintomatologia dolorosa e a possibilidade de determinar a presença de microrganismos resistentes aos antimicrobianos prescritos em odontologia, o que contribuirá para o estabelecimento de protocolos de atendimento de urgência. Tal fato beneficia ambas as instituições envolvidas, os pacientes, e a sociedade como um todo (página 56).

QUESTÃO 6: Qual benefício na participação do GHC para instituição e seus pacientes?

RESPOSTA: Conforme incluído no texto, o indivíduo não terá nenhum benefício adicional direto resultante de sua participação na pesquisa. Os procedimentos clínicos executados no tratamento endodôntico de urgência visam o tratamento da condição clínica de dor e infecção e não diferem daqueles normalmente empregados. Os benefícios esperados afetam indiretamente os voluntários, pois estarão relacionados ao controle da sintomatologia dolorosa e a possibilidade de determinar a

Endereço: Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2407 **Fax:** (51)3357-2407 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br



Continuação do Parecer: 1.201.885

presença de microrganismos resistentes aos antimicrobianos prescritos em odontologia. Entretanto, sabe-se que a terapia antibiótica sistêmica em endodontia é aplicada quando os pacientes apresentam edema progressivo e sinais e sintomas de infecção incluindo febre, mal-estar e linfadenopatia. Os antibióticos -lactâmicos, especialmente penicilinas, tem sido recomendado como os antibióticos de primeira escolha, pois apresentam bons resultados contra bactérias e possuem poucos efeitos adversos. No entanto a atividade das penicilinas tem diminuído frente as bactérias causadoras de infecções odontogênicas, como *Streptococcus spp.*, em virtude sobretudo da automedicação. Assim é necessário monitorar periodicamente a resistência de microrganismos frente a agentes antimicrobianos, contribuindo para o estabelecimento de protocolos de atendimento de urgência. Tal fato beneficia o GHC como instituição, os pacientes, e a sociedade como um todo. Este monitoramento é importante pois fornece dados adicionais para Comissões Institucionais de Controle de Infecção, especialmente em estabelecimentos de saúde (página 39).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

N/A

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

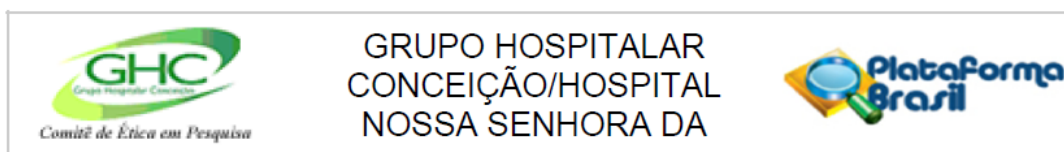
Pendências atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PAULINE-GHC-PROJETO I.docx	19/06/2015 16:15:38		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	PAULINE-GHC-TCLE-APENDICE 1 - I.docx	19/06/2015 16:15:52		Aceito
Outros	PAULINE-GHC-CARTA-I.docx	19/06/2015 16:17:07		Aceito

Endereço: Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2407 **Fax:** (51)3357-2407 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br



Continuação do Parecer: 1.201.885

Outros	PAULINE-GHC-TERMO ANUÊNCIA l.jpg	19/06/2015 16:17:45		Aceito
Outros	FORM GHC Compromisso.jpg	19/06/2015 16:17:59		Aceito
Outros	FORM GHC Integrantes.pdf	19/06/2015 16:18:10		Aceito
Outros	CURRICULO - FRANCISCO MONTAGNER.pdf	08/07/2015 10:25:59		Aceito
Outros	CURRICULO - MARIA BEATRIZ.pdf	08/07/2015 10:26:16		Aceito
Outros	CURRICULO - PAULINE LANG.pdf	08/07/2015 10:26:35		Aceito
Folha de Rosto	Plataforma Prof Francisco.pdf	08/07/2015 10:25:01		Aceito
Outros	Termo de Anuência GHC(1).pdf	08/07/2015 15:33:27		Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_541507.pdf	08/07/2015 15:37:58		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 26 de Agosto de 2015

Assinado por:
Daniel Demétrio Faustino da Silva
(Coordenador)

Endereço: Francisco Trein, 596 - Bloco H, 3º andar, Escola GHC (HNSC), sala 11
Bairro: CRISTO REDENTOR **CEP:** 91.350-200
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3357-2407 **Fax:** (51)3357-2407 **E-mail:** cep-ghc@ghc.com.br