SUSCETIBILIDADE DE PATÓGENOS ISOLADOS DE CANAIS RADICULARES AOS ANTIBIÓTICOS PRESCRITOS EM ENDODONTIA E DETECÇÃO DA PRESENÇA E EXPRESSÃO DE GENES PARA LACTAMASES

Vanessa Scheffer de MATTOS, Francisco MONTAGNER

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA CONSERVADORA - ÁREA DE ENDODONTIA

vanessascheffer86@hotmail.com

INTRODUÇÃO

Embora diferentes estudos indiquem que há um aumento da resistência dos microrganismos aos antimicrobianos prescritos em Endodontia, pouco se sabe sobre importância e a relação da presença e expressão de genes associados à produção de β-lactamases em cepas isoladas de canais radiculares. O presente projeto de pesquisa se insere na nova tendência de descrever características associadas à patogenicidade dos microrganismos envolvidos nas infecções endodônticas, verificando a presença de fatores genéticos que podem modular a sua expressão.

OBJETIVO

- Descrever o perfil de suscetibilidade de microrganismos obtidos em infecções endodônticas sintomáticas frente aos agentes antimicrobianos prescritos em Endodontia.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) para as bactérias isoladas pertencentes aos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Parvimonas*;
- Investigar genes associados a enzimas lactamases;
- Determinar presença de enzimas lactamases.

MATERIAL E MÉTODOS

- Projeto aprovado na COMPESQ-ODO e no CEP-UFRGS.
- Amostra: *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Parvimonas*
- Origem: 20 pacientes – canais radiculares de dentes que apresentavam-se com necrose pulpar e sintomatologia dolorosa espontânea.
- Identificação microbiana realizada através de testes fenotípicos (requerimento gasoso, morfologia celular, coloração de Gram) e testes bioquímicos (RapidID 32A, Biomerieux, França)
  - ✓ 9 cepas de *Parvimonas* spp.
  - ✓ 2 cepas de *Porphyromonas* spp.
  - ✓ 18 cepas de *Prevotella* spp.
- Microrganismos congelados e em cultura pura (-80°C).

3.1.REATIVAÇÃO DAS BACTÉRIAS

3.2.TESTE DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

3.2.1.Epsilometer Test (E-test) (Biodisk, Solna, Suécia)

Tabela 1. Tabela com as CIMs para a determinação dos perfis de suscetibilidade (NCLSI, CLSI, 2007).

AGENTE ANTIMICROBIANO	CIM (µg/mL)		
	S*	I*	R*
Penicilina G	≤0.5	1	≥2
Amoxicilina	≤4	8	≥16
Amox.+ Ác. Clavulânico	≤2	4	≥8

Figura 2.

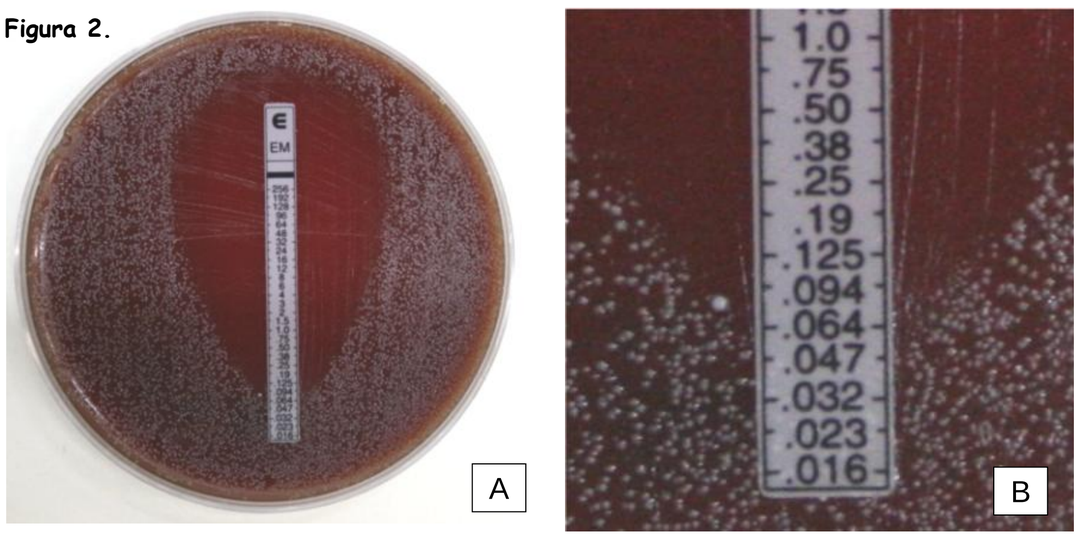

Figura 2. A) Placa contendo o microrganismo e a fita antibiótica, apresentando halo de inibição. **B)** Determinação da concentração inibitória mínima, correspondente à intersecção do halo com a fita de ATB. C) Valores de referência fornecidos pela NCCLS (2007): S – suscetível; I – intermediário; R – resistente.

3.3.TESTE DE PRODUÇÃO DE BETA-LACTAMASES: NITROCEFIN (GLAXO RESEARCH 87/312) – OXOID, HAMPSHIRE, UK.

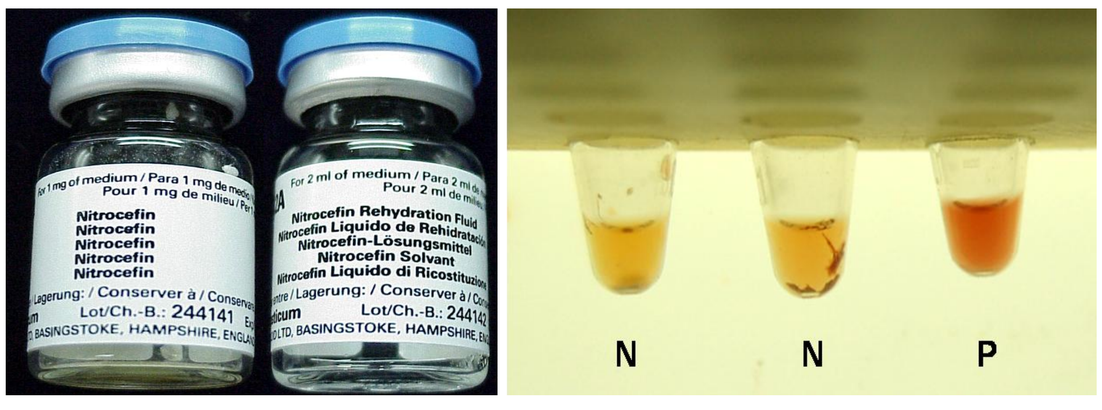

Figura 3. A) Nitrocefin®. **B)** Resultado positivo (vermelho) ou negativo (amarelo).

3.4.DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE cfxA/cfxA2

3.4.1.Isolamento do DNA Microbiano

Figura 4 – A) Amostras clínicas; B) Kit para lise celular; C) Incubação a (56°C); D) Amostras em banho d'água (2 horas); E) Segunda incubação (70°C, 10 min); F) Coluna para extração de DNA; G) Filtro para retenção do DNA; H) Centrífuga para remoção de líquidos e lavagem; I) Amostras na centrífuga; J) Interior da coluna com resíduos celulares e DNA; L) Resíduos celulares; M) Purificação do DNA; N) Eluição do DNA; O) DNA suspenso em solução tampão.

3.4.2.Detecção da presença dos gene *cfx*A/*cfx*A2

- Técnica de PCR simples
  - ✓ Primers específicos para o gene cfxA/cfxA2 (Giraud-Morin et al., 2003)
  - ✓ Controle positivo: *Bacteroides vulgatus* CLA 341.
  - ✓ Controle negativo: E*scherichia coli* produtoras de TEM-1 e SHV-1.
- Verificação da presença do gene:
  - ✓ Técnica de eletroforese em agarose 2%
  - ✓ Reações positivas: bandas em comprimento apropriado.

Figura 5 – Preparo da reação de PCR: A) Reagentes empregados para a mistura da PCR: água milli-Q, tampão para enzima Taq DNA Polymerase, Cloreto de Magnésio, solução contendo dNTPs, enzima Taq DNA Polymerase. B) *Primers* empregados na reação. C) Mistura para reação de PCR. D) Distribuição da mistura para a reação de PCR nos microtubos contendo as amostras. E) Termociclador.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

- Pacote estatístico – SPSS v. 19.0 for Windows ®
- As cepas serão classificadas em suscetíveis, intermediárias e resistentes
- A concentração inibitória mínima representativa dos gêneros estudados será determinada pela mediana dos valores individuais.
- A freqüência da presença do gene *cfx-A/cfx-A2* através de PCR nos isolados clínicos será determinada.
- O Teste McNemar será empregado para testar a hipótese nula de que não há relação entre a presença do gene *cfx-A/cfx-A2* e a expressão de resistência aos agentes beta-lactâmicos utilizados.

CRONOGRAMA

O período previsto para a execução deste projeto será de 36 meses.

ANO	2010	2011				2012				2013		
TRIMESTRE	OUT NOV DEZ	JAN FEV MAR	ABR MAI JUN	JUL AGO SET	OUT NOV DEZ	JAN FEV MAR	ABR MAI JUN	JUL AGO SET	OUT NOV DEZ	JAN FEV MAR	ABR MAI JUN	JUL AGO SET
Reativação dos Isolados Clínicos	■	■										
Teste de Suscetibilidade (E-test)		■	■	■	■							
Teste de Suscetibilidade (Lactamase)		■	■	■	■							
Extração do DNA microbiano						■	■					
Padronização da Reação de PCR								■				
Análise das amostras (PCR)									■	■		
Análise dos dados											■	
Divulgação dos resultados												■

a) Primeira etapa – Reativação dos isolados clínicos, testes de suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (E-test) e teste de produção de lactamases (Nitrocefin).
b) Segunda etapa – Extração do DNA microbiano, padronização das reações de PCR, execução da análise das amostras através de PCR Simples. Análise dos dados. Os resultados serão divulgados em eventos da área e publicações.