

ENTEROCOCCUS FAECALIS EM RETRATAMENTOS ENDODÔNTICOS E EM CASOS DE INFECÇÃO PRIMÁRIA ASSOCIADOS À PERIODONTITE APICAL ASSINTOMÁTICA

Enterococcus faecalis in root-filled teeth and primary endodontic infection associated with apical periodontitis

Maíra P. de Farias Costa

Departamento de morfologia - Universidade Federal de Sergipe – UFS
Doutoranda em Odontologia (SL Mandic)
mairafcosta@hotmail.com

José Antônio B. Alves

Departamento de morfologia, Lab. de Microbiologia Aplicada - Universidade Federal de Sergipe – UFS

Alaíde H. de Aguiar Oliveira

Departamento de morfologia, Lab. de Microbiologia Aplicada - Universidade Federal de Sergipe – UFS

Patrícia O. Santos

Departamento de morfologia, Lab. de Microbiologia Aplicada - Universidade Federal de Sergipe – UFS

Rita de Cássia Trindade

Departamento de morfologia Lab. de Microbiologia Aplicada - Universidade Federal de Sergipe – UFS
ritinhat@hotmail.com

Maria Cristina Almeida de Souza

Doutoranda em Odontologia (SL Mandic)
mcas.souza@uol.com.br

Endereço para correspondência:

Dr. Rita de Cássia Trindade
Cidade Universitária Prof. José Aloísio de Campos
Av. Marechal Rondon, S/N, CCBS - Bloco 145 - Sala 15 –
São Cristóvão, Sergipe, SE. E-mail: ritinhat@hotmail.com

Recebido em 31/03/2010

Aceito em 05/05/2010

RESUMO

Objetivo: investigou-se a presença de *Enterococcus faecalis* em 25 dentes submetidos à retratamento endodôntico e em 10 casos com infecção endodôntica primária, ambos associados à periodontite apical assintomática. Realizou-se coleta microbiológica e análise dos isolados clínicos por método de cultura tradicional e sistema automatizado. Dos 25 casos de retratamento, 18 apresentaram *E. faecalis*. Nos 10 casos de infecção primária, dois apresentaram o microrganismo. O percentual de ocorrência de *E. faecalis* foi mais elevado nos dentes submetidos à retratamento que nos casos de infecção primária. O percentual de ocorrência de *E. faecalis* foi mais elevado nos dentes submetidos à retratamento (72%) que nos casos de infecção endodôntica primária (20%). No entanto, para melhor entender o papel desse microrganismo na infecção endodôntica, mais casos de infecção primária e de retratamento sem evidência de periodontite apical devem ser investigados, para que de fato se esclareça a importância do *E. faecalis* no insucesso endodôntico.

Palavras-chave: clorexidina; *Enterococcus faecalis*; hidróxido de cálcio.

ABSTRACT

The aim of this study was investigate the presence of *E. faecalis* in samples obtained from 25 previously root-filled teeth and 10 cases of primary endodontic infection, both of which were associated with asymptomatic apical periodontitis. Microbiological sampling was carried out, than the samples were analyzed by conventional culture methods and MicroScan Gram-positive identification panel. Results showed that of the 25 cases of previously root-filled teeth, *E. faecalis* occurred in 18, and in 10 cases of primary endodontic infection, *E. faecalis* occurred in two teeth. The data of this investigation showed a higher occurrence of *E. faecalis* in root-filled teeth (72%) compared with cases primary endodontic infection (20%). However, to better understand the role of bacteria in endodontic infection, most cases of primary infection and re-treatment without evidence of apical periodontitis should be investigated, so that in fact makes clear the importance of *E. faecalis* in endodontic failure.

Keywords: Chlorhexidine; *Enterococcus faecalis*; calcium hydroxide.

INTRODUÇÃO

O papel dos microrganismos no desenvolvimento das patologias pulpares e periapicais está bem estabelecido (KAKEHASHI; STANLEY; FITZGERALD, 1965). Embasada neste conhecimento, a terapia endodôntica visa à eliminação ou à redução substancial da carga microbiana do sistema de canais radiculares (NAIR; HENRY; CANO; VERA, 2005).

A infecção endodôntica primária é usualmente de natureza polimicrobiana, havendo um predomínio de bactérias anaeróbias estritas (LANA et al., 2001; GOMES et al., 2004). Nos casos de retratamentos associados à periodontite apical, essa microbiota difere marcadamente, com predominância de bactérias anaeróbias facultativas e Gram positivas (GOMES et al., 2004; SUNDQVIST et al., 1998). Estudos recentes demonstram que o *Enterococcus faecalis*, um anaeróbio facultativo Gram positivo, é o microrganismo mais comumente associado a esses casos (MOLANDER; REIT; DAHLÉN; KVIST, 1998).

A erradicação ou redução da carga microbiana do sistema de canais radiculares é alcançada por meio de preparo químico-mecânico e de medicação intracanal. Apesar desta terapia, alguns microrganismos podem persistir neste sistema de canais. O hidróxido de cálcio tem sido a medicação mundialmente mais empregada na Endodontia e vem se mostrando efetiva contra uma variedade de microrganismos. No entanto, o *E. faecalis* parece ser resistente a esse medicamento devido a sua tolerância a um alto pH e a sua capacidade de sobreviver em ambientes adversos (DAHLÉN, SAMUELSSON, MOLANDER, REIT, 2000). Como consequência, esta espécie pode permanecer viável no sistema de canais radiculares e manter a periodontite apical. A grande ocorrência de *E. faecalis* em casos de retratamento com periodontite apical tem sugerido que este microorganismo está diretamente relacionado ao insucesso endodôntico. Este estudo buscou investigar a presença desse microrganismo em casos de retratamento e em infecções primárias, ambos associados à periodontite apical assintomática.

MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe (UFS) e todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Foram selecionados vinte e oito pacientes que necessitavam de tratamento ou retratamento endodôntico. Por meio de exames clínicos e radiográficos, selecionaram-se 35 dentes: 25 apresentavam tratamento endodôntico concluído há mais de 4 anos e 10 apresentavam necrose pulpar, todos os casos associados à lesão perirradicular assintomática. Foram excluídos do estudo pacientes que haviam sido submetidos à terapia antibiótica nos três meses anteriores ao início dos procedimentos, que apresentavam manifestações sistêmicas importantes, dentes com bolsa periodontal, fraturas radiculares, comunicação entre a lesão perirradicular e o meio bucal e, nos casos de retratamento, aqueles que tinham material obturador exposto ao meio bucal.

Procedimentos Clínicos

Inicialmente todos os 35 dentes foram submetidos à profilaxia. Coroas protéticas e pinos metálicos, quando existentes, foram removidos com o auxílio de saca-prótese e extrator de pino intra-radicular. Em seguida, foram isolados com dique de borracha. Fez-se a anti-sepsia do campo operatório e do dente com peróxido de hidrogênio a 3%, hipoclorito de sódio a 2,5% e para inativação das soluções, utilizou-se tiosulfato de sódio a 5%.

Realizou-se cirurgia de acesso, quando necessário e após, a câmara pulpar e o campo operatório foram desinfetados novamente com bolinhas de algodão esterilizadas, embebidas em hipoclorito de sódio a 2,5% inativado por solução de tiosulfato de sódio a 5%. Os dentes submetidos à remoção de pinos intra-radulares sofreram assepsia do espaço protético. Para controle da desinfecção do campo, bolinhas de algodão eram esfregadas nas coroas e no campo e, em seguida, submetidas a exames microbiológicos.

Nos dentes que já apresentavam tratamento endodôntico, o material obturador foi removido com broca de Peeso e/ou brocas de Gates Glidden; o material localizado na região mais apical foi retirado com o auxílio de limas manuais. Executou-se a remoção do material obturador sem o auxílio de solventes químicos. A partir desse momento, tanto os dentes com necrose quanto os casos de retratamento foram submetidos aos mesmos procedimentos de coleta.

Coleta dos Espécimes Clínicos

Introduziu-se uma lima endodôntica à distância de 1 mm do ápice radiográfico e realizou-se ligeira instrumentação nas paredes do canal. O conteúdo do canal

radicular foi absorvido por quatro pontas de papel, consecutivamente e cada ponta permaneceu no interior do canal por um 1 minuto. O material coletado foi transferido para tubos de ensaio contendo 4 ml de caldo azida dextrose (Difco-Detroit-Mi-USA).

Procedimentos Laboratoriais

Os tubos de ensaio foram incubados em estufa a 37°C, por um período de até 72 horas. Após, retirou-se das amostras positivadas, uma alçada que foi semeada em placas tipo Petri contendo Agar bile esculina. As placas com o inóculo foram incubadas a 37°C por 24 horas em estufa. Nas culturas em que se observou crescimento microbiano com escurecimento do meio, escolheram-se cinco colônias morfológicamente semelhantes, que foram transferidas para tubos com caldo BHI (Oxoid, Basingsloke, UK).

Esses tubos foram incubados por 12 a 24 horas, quando uma alçada do caldo foi coletada e semeada em placas do tipo Petri com Agar BHI, incubadas a 37°C por 24 horas, para obtenção de biomassa. As células foram ressuspensas em solução salina em uma concentração de aproximadamente 3×10^8 célula ml⁻¹, que equivale ao tubo nº 1 da escala de Macfarland. A partir daí, realizaram-se testes fisiológicos convencionais para caracterização do gênero *Enterococcus* e identificação da espécie *E. faecalis* (8).

O *Enterococcus faecalis* foi identificado segundo o tipo de coloração de Gram, crescimento em 6,5% de cloreto de sódio, utilização do piruvato de sódio e tolerância ao telurito de potássio. As amostras que positivaram nos testes convencionais foram também submetidas à leitura automatizada. Para tanto, utilizaram-se painéis tipo Pos Combo 21 Microscan para bactérias Gram positivas (Dade Behring, California, USA). A leitura dos painéis se realizou em aparelho Auto-Scan4 (Dade Behring, Califórnia, USA).

RESULTADOS

Verificou-se que o percentual de amostras positivas para o *E. faecalis* foi mais elevado entre os casos de retratamento (72%) que entre os casos de necrose pulpar (20%). Esses resultados foram submetidos à análise estatística e, por meio do teste exato de Fisher, comprovou-se diferença significativa entre os dois casos em nível de significância de 5,0% ($p < 0,05$).

Como mostra a tabela 1, dos 10 casos de infecção primária, isolou-se *E. faecalis* em duas amostras (20%). Já nos 25 casos de retratamento foi possível isolá-lo em 18 amostras (72%). Sendo assim, a maior ocorrência desse microrganismo aconteceu nos casos de retratamento.

TABELA 1. Avaliação da ocorrência de *E. faecalis* segundo o tipo de amostra

Amostras	Ocorrência de <i>E. faecalis</i>				TOTAL		Valor de p
	Positivo		Negativo		N	%	
	N	%	N	%	N	%	
Infecção endodôntica primária	2	20.0	8	80.0	10	100.0	$p^{(1)} = 0.0082^*$
Retratamento	18	72.0	7	28.0	25	100.0	
Total	20	57.1	15	42.9	35	100.0	

(*) – Diferença significativa em nível de 5.0%.

(1) – Teste de Fisher.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Nas duas últimas décadas, deu-se atenção especial à microbiota endodôntica de tratamentos cuja terapia en-

dodôntica fracassou. Investigações dessa microbiota, tanto por métodos de cultura tradicional quanto por meio de técnicas moleculares revelam uma variação na frequência de *Enterococcus faecalis* de 32% a 78% (HANCOCK,

SIGURDSSON, TROPE, MOISEWITSCH, 2001; ZOLLETI, SIQUEIRA JR, SANTOS, 2006). Usando métodos de cultura tradicional e identificação automatizada, resultado semelhante foi obtido neste estudo. A ocorrência de *E. faecalis* em dentes submetidos a retratamento endodôntico foi de 72%. Contudo, contrário aos nossos resultados, Cheung and Ho, por meio de técnicas convencionais, não observaram *E. faecalis* quando estudou casos de retratamento associado à periodontite apical assintomática. Esses autores, para seleção dos casos, examinaram os dentes por meio de microscópio operatório, objetivando confirmar a ausência de infiltração marginal e possíveis linhas de fratura que viessem a existir na estrutura dental. Esta análise possibilitou uma seleção com risco de infiltração marginal minimizado. A penetração de microrganismos no sistema de canais radiculares devido a restaurações coronárias deficientes tem sido considerada.

Em alguns dos nossos casos, a análise radiográfica dos dentes submetidos à retratamento endodôntico apresentavam falhas na obturação. A observação da alta frequência (72%) de *E. faecalis* sugere que as condições ecológicas do sistema de canais radiculares, favorece a proliferação deste microrganismo, similarmente às observações feitas por Peciulienė et al. Esses microrganismos apresentam características peculiares que lhes possibilitam sobreviver por longos períodos em ambientes com escassez nutricional (FIGDOR; DAVIES; SUNDQVIST, 2003), invadir túbulos dentinários (LOVE, 2001), expressar proteínas com a capacidade de unirem-se à dentina, tais como protease serina, gelatinase e colagenase (HUBBLE et al., 2003); ainda têm a capacidade de sobreviver em monoinfecção, sem necessitar de inter-relações sinérgicas com outras bactérias, sendo isolados, muitas vezes em cultura pura (GOMES et al., 2004); suportam ambientes com pH elevado (MCHUGH, ZHANG, MICHALEK, ELEAZER, 2004), o que lhes conferem resistência à terapia endodôntica à base de hidróxido de cálcio. Às peculiaridades desse microrganismo adicionam-se algumas variáveis clínicas que contribuem para o ingresso e a permanência do *E. faecalis* no sistema de canais radiculares já tratados endodônticamente, tais como infiltração coronária, canais pobremente obturados, restaurações com infiltrações marginais, tornando esse ambiente, um sítio oportuno, na cavidade bucal, à permanência e à proliferação do microrganismo.

A alta frequência de *E. faecalis* em casos de retratamento com periodontite apical sugeriu que ele desempenhasse um papel preponderante na manutenção das lesões perirradiculares (SIQUEIRA JR, RÔÇAS, 2004). Entretanto, publicações recentes vêm questionar a participação desse microrganismo na manutenção dessas lesões. A análise microbiológica de dentes submetidos à retratamento sem evidência radiográfica de periodontite apical demonstrou *E. faecalis* em 81,5% dos casos, e aqueles com evidência radiográfica de periodontite apical apresentaram o microrganismo em 78% dos casos (ZOLLETI, SIQUEIRA JR, SANTOS, 2006). Esses resultados vêm ratificar a grande ocorrência do *E. faecalis* nos retratamentos endodônticos, mas sua importância como causa da persistência das lesões perirradiculares deve ser melhor investigada.

Em pesquisas recentes, por meio de técnicas de cultura, o *E. faecalis* foi recuperado de infecções primárias em menor frequência que nos casos de retratamento (FERRARI; CAI; BOMBANA, 2005), corroborando, dessa forma, os nossos resultados. No entanto, estudos que utilizaram técnicas moleculares detectaram o microrganismo em 82% e em quase 90% das amostras, resultados que atestam alta ocorrência de *E. faecalis* também em casos de infecção primária (GOMES et al., 2006; SASSONE). No presente estudo, que utilizou a mesma técnica de coleta e cultura para os casos de infecção primária e retratamento, o percentual de amostras positivas foi mais elevado nos casos de retratamento que naqueles de infecção primária. Obviamente, os métodos moleculares são mais eficientes na detecção de microrganismos devido à sua alta sensibilidade e especificidade. Talvez o *E. faecalis* esteja presente em menor número nos casos de infecção primária e as células obtidas na amostra podem estar aquém do limite de detecção dos métodos de cultura. De fato, um menor número de células pode estar presente nas infecções de natureza primária, porém, com as mudanças ecológicas ocorridas no sistema de canais radiculares durante a terapia endodôntica, esse microrganismo que tolera ambientes alcalinos, carência de nutrientes e sobrevive em monoinfecção pode permanecer viável e proliferar nesse sistema de canais. Pesquisas têm demonstrado a prevalência de bactérias anaeróbias facultativas e Gram positivas após as manobras de preparo químico-mecânico e de medicação intracanal (LANA et al., 2001; DAHLÉN; SAMUELSSON; MOLANDER; REIT, 2000). O risco de a microbiota ser dominada por

Gram positivos depois do tratamento e vários serem facultativos, conduz à necessidade de se esclarecer se o resultado do tratamento depende da completa eliminação dessas bactérias.

Em resumo, este estudo confirmou a maior ocorrência de *E. faecalis* nos casos de retratamento associado à periodontite apical assintomático que nos casos de infecção endodôntica de natureza primária. No entanto, para melhor entender o papel desse microrganismo na infecção endodôntica, mais casos de infecção primária e de retratamento sem evidência de periodontite apical devem ser investigados, para que de fato se esclareça a importância do *E. faecalis* no insucesso endodôntico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20:340-9.
2. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera, J. Microbial status of apical root system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99:231-52.
3. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdam JS, Nicolí JR, Carvalho MAR, De M Farias, L. Microorganisms isolated from root canal presenting necrotic pulp and their susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16:100-5.
4. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Souza ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:71-6
5. Sundqvist G, Figdor D, Endo D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:86-93.
6. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31:1-7.
7. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. *Oral Microbiol Immunol* 2000; 15:309-12.
8. Hancock HH III, Sigurdsson A, Trope M, Moisewitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91:579-86.
9. Zolleti GO, Siqueira JF Jr, Santos KRN. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture - dependent and - independent approaches. *Journal of Endodon* 2006; 32:722-6.
10. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:234-9.
11. Love RM. *Enterococcus faecalis* - a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.
12. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 2003; 18:121-6.
13. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in Vitro. *J Endodon* 2004; 30:218-9.
14. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction - based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97:85-94.
15. Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J* 2005; 33:372-80
16. Gomes BPFA, Pinheiro ET, Souza ELR, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. *Enterococcus faecalis* in dental root canals detected by culture and polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102:247-53.
17. Sassone LM, Fidel R, Faveri M, Fidel S, Figueiredo L, Feres M. Microbiological evaluation of endodontic infection in teeth with and without sinus tract. *Int Endod J* 2008; 41: 508-515.