

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

CAMILA ALCAZAR BARCELOS

BRUNA GABRIELA BORN

**Influência da Higienização do Paciente na Presença de *Enterococcus*
Faecalis na Cavidade Bucal.**

BAURU

2007

UNIVERSIDADE DO SAGRADO CORAÇÃO

CAMILA ALCAZAR BARCELOS

BRUNA GABRIELA BORN

**Influência da Higienização do Paciente na Presença de *Enterococcus*
Faecalis na Cavidade Bucal.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia sob orientação do Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte.

BAURU
2007

B242i

Barcelos, Camila Alcazar.

Influência da higienização do paciente na presença de *Enterococcus faecalis* na cavidade bucal. / Camila Alcazar Barcelos e Bruna Gabriela Born. -- 2007.
30 f.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte
Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) -
Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP.

1. Enterococcus faecalis 2. Boa e má higiene
3. Cavidade bucal I. Born, Bruna Gabriela II. Duarte,
Marco Antonio Húngaro III. Título.

CAMILA ALCAZAR BARCELOS

BRUNA GABRIELA BORN

**Influência da Higienização do Paciente na Presença de *Enterococcus Faecalis*
na Cavidade Bucal.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências da Saúde como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Odontologia sob orientação do Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte.

Banca Examinadora: Prof. Dr. Marco Antonio Húngaro Duarte

Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth

Bauru, 19 de novembro de 2007.

SÚMULA CURRICULAR

Nome: Camila Alcazar Barcelos

Data de Nascimento: 27/06/1981

Filiação: Maria Cristina Alcazar Barcelos
Lázaro Barcelos

Ensino Fundamental: Colégio Interativo – Bauru - SP

Ensino Médio: Colégio Interativo – Bauru - SP

Ensino Superior: Universidade do Sagrado Coração – Bauru - SP

Nome: Bruna Gabriela Born

Data de Nascimento: 24/10/1985

Filiação: Marcia Eliza Born
Vitor Hugo Born

Ensino Fundamental: Colégio Santa Teresinha – Taquara - RS

Ensino Médio: Instituto Adventista Cruzeiro do Sul – Taquara - RS

Ensino Superior: Universidade do Sagrado Coração – Bauru - SP

RESUMO

Este trabalho teve como principal objetivo a análise da presença de *Enterococcus faecalis* na cavidade bucal em pacientes com má e boa higiene, por meio de PCR, e comparar se a higiene é fator determinante na ausência ou presença do mesmo. O exame foi realizado na clínica de Odontologia, onde foram selecionados 30 pacientes com boa higiene e 30 pacientes com má higiene bucal e identificado por números para que os nomes fossem preservados durante a divulgação. A coleta foi realizada por fricção com uma zaragatoa de algodão estéril em toda cavidade bucal, não determinando sítios. Após a coleta, a zaragatoa foi acondicionada em um endorfe hermeticamente fechado e transportada para o laboratório de microbiologia da Universidade do Sagrado Coração. A análise da presença e ausência foi feita por PCR (Polimerase Chain Reaction). Comparando os pacientes com boa higiene e má higiene bucal, os resultados apresentaram um aumento de 20%, sendo que apenas 1 (um) paciente com boa higiene apresentou *Enterococcus faecalis* presente na cavidade bucal, correspondendo a 3,33%, contra 7 (sete) pacientes com má higiene bucal, o que representa 23,3%, sendo esta diferença estatisticamente significativa. No entanto, o presente trabalho vem chamar a atenção sobre os riscos de deixar os dentes abertos e de se realizar restaurações mal feitas, principalmente em pacientes com má higiene, uma vez que essa bactéria se mostra bastante resistente a antibióticos como vancomicina e algumas raras cepas a ampicilina e também a alguns irrigantes endodônticos e curativos, já que o *Enterococcus faecalis* está presente em 64% dos fracassos endodônticos.

Palavras – chave: *Enterococcus faecalis*, boa e má higiene, cavidade bucal.

ABSTRACT

This work had as main objective the analysis of the presence of *Enterococcus faecalis* in the oral cavity in patients with harm and good hygiene by means of PCR and to compare if the hygiene is determinative factor in its absence or presence of the same. The examination was carried through in the clinic of Odontology, where 30 patients with good hygiene and 30 patients with bad hygiene oral and identified by numbers had been selected so that the names were preserved during the spreading. The collection was carried through by friction with one swab of barren cotton in all oral cavity, not determining small farms. After the collection, swab was conditioned in one criotubes totality closed and carried to the microbiology laboratory of the University of the Sacred Heart. The analysis of the presence or absence was made by PCR (Reaction in chain of polimerase). Comparing the patients with good hygiene and harm oral hygiene, the results had presented a 20% increase, being that only 1 (one) patient one with good hygiene presented present *Enterococcus faecalis* in the oral cavity, corresponding 3.33%, against 7 (seven) patient ones with bad oral hygiene, what it represents 23.3%, being this significant difference statistics. However, the present work comes to call the attention on the risks to leave open teeth and if carrying through badly done restorations, mainly in patients with bad hygiene, a time that this bacterium if also shows sufficiently resistant to the antibiotics as vancomycin and some rare cells the ampicilin and to some inside of the canal medicaments and dressings, since the *Enterococcus faecalis* is present in 64% of the endodontics failures.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, good and bad hygiene, oral cavity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Objetivo	9
2. DESENVOLVIMENTO	10
2.1. Revisão de literatura	10
2.2. Metodologia	15
2.2.1. Extração do DNA	15
2.2.2. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	16
2.2.3. Eletroforese	16
2.3. Resultados	18
3. DISCUSSÃO	20
3.1. Da Metodologia	20
3.2. Dos Resultados	23
4. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	30

1. Introdução

Espécies bacterianas pertencentes ao gênero *Enterococcus* podem ser encontradas em diversos envoltórios, tais como o trato gastrointestinal de humanos e outras espécies, plantas e solo. Estes microrganismos também são capazes de colonizar o trato genitourinário e cavidade oral.

Das espécies de *Enterococcus*, o *Enterococcus faecalis* é a mais comumente detectada, estando presente em infecções orais como periodontite marginal, infecções endodônticas e abscesso periradicular.

O *Enterococcus faecalis* é um anaeróbio facultativo, fermentativo, Gram-positivo, apresentando forma ovalada e com diâmetro de 0,5 a 1,0 micrometro, podendo apresentar-se isolado ou em pequenas cadeias. Tem sido relacionado à endocardite infecciosa, em infecções hospitalares, e, além disso, tem apresentado resistência a muitos antibióticos.

A ocorrência em infecções endodônticas tem-se mostrado em grande número, principalmente em casos de fracassos endodônticos.

Sundqvist et al em 1998 evidenciaram grande relação entre os fracassos endodônticos com a presença de *Enterococcus faecalis*, sendo que em torno de 30% dos fracassos eram causados pela monoinfecção do citado microrganismo.

Peciulienė et al no ano de 2001, analisando a presença de fungos e bactérias entéricas em dentes obturados e com lesão periapical, isolaram o *Enterococcus faecalis* em 21 de 33 dentes com cultura positiva, sendo onze em cultura pura, ou seja, como o único microrganismo presente. O crescimento foi detectado após a segunda cultura em 10 dentes.

Em 2003, Pinheiro et al, analisando também o tipo de microrganismo presente em dentes obturados com fracasso endodôntico, verificaram que 57,4% eram espécies de anaeróbios facultativos, sendo que 83,3% eram Gram-positivos. Observaram também que o *Enterococcus*

faecalis foi a espécie bacteriana mais comumente encontrada.

Analisando a associação de *Enterococcus faecalis* com diferentes formas de doença periradicular, Rôças et al (2004) observaram a presença desta espécie em 7 de 21 dentes com lesão periradicular crônica assintomática, em 1 caso de 10 dentes com periodontite apical aguda e em 1 de 19 amostras de pus aspiradas de abscessos periradiculares agudos. Verificaram que o *Enterococcus faecalis* está significativamente mais associado com casos assintomáticos do que com casos sintomáticos. Quanto aos fracassos endodônticos o *Enterococcus faecalis* estava presente em 20 de 30 dentes. No confronto entre dentes com infecção primária e em casos com infecção persistente, verificaram maior relação com casos de infecção persistente.

No entanto, o questionamento é: por que tanta preocupação com *Enterococcus faecalis*?

Na verdade este microrganismo tem demonstrado grande resistência, principalmente ao hidróxido de cálcio, um curativo amplamente empregado no interior do canal para o tratamento de infecções endodônticas.

Evans et al (2002), estudando o mecanismo envolvido na resistência do *Enterococcus faecalis* ao hidróxido de cálcio verificaram ser esta devido a uma bomba iônica ativa.

Devido a esta grande resistência é que ele está fortemente relacionado com os casos de fracassos endodônticos.

Entretanto, a dúvida é como ele contamina o canal radicular. Ureña (1995) cita que ele atinge o canal radicular via anacorética.

No entanto é citado com sendo a espécie de *Enterococcus* mais comumente encontrada na cavidade oral.

A literatura, porém, é escassa em determinar se ele está presente na cavidade oral de todos os pacientes ou em apenas uma porcentagem de pacientes que apresentam má higiene, ficando então esta dúvida para ser esclarecida.

1.1 Objetivo:

O objetivo do presente trabalho foi identificar a presença de *Enterococcus faecalis* na cavidade bucal em pacientes com má e boa higiene por meio de PCR e comparar se a higiene é fator determinante na sua ausência ou presença.

2. Desenvolvimento

2.1. Revisão de Literatura

Sundqvist et al (1998) analisaram microbiologicamente dentes com falha no tratamento endodôntico e o resultado do retratamento conservador. Para isso, utilizaram 54 dentes, todos assintomáticos, que previamente tinham tratado o canal e que mostravam evidências radiográficas de lesões periapicais. O canal foi limpo com peróxido de hidrogênio a 30% e após esfregou-se tintura de iodo a 5%. Depois de seca, a superfície do dente foi esfregada com tiosulfato de sódio a 5% para desativar a tintura de iodo de modo a não influenciar nas amostras coletadas. A obturação foi removida com uma lima sem uso de solventes. A partir de então foram retiradas as amostras bacteriológicas. Todas as amostras foram colocadas em caixas anaeróbicas com atmosfera de 10% de hidrogênio e 5% de dióxido de carbono e nitrogênio. A taxa de sucesso onde o *E. faecalis* foi isolado, foi de modo a mais baixa (66%) do que a média para todo o material. O *E. faecalis* parece ser altamente resistente à medicação usada durante o tratamento e é um dos poucos microrganismos que se mostraram in vitro, resistir ao efeito antibacteriano do hidróxido de cálcio. Mostrou-se também que os *Enterococcus* têm habilidade de sobreviver em canais como simples organismos sem a ajuda de outras bactérias. O *E. faecalis* foi isolado em 38% dos dentes que tinham organismos recuperáveis, o que sugere que é um importante agente no fracasso endodôntico.

Peciulienė et al (2001) realizaram um estudo isolando a levedura da bactéria entérica em dentes tratados endodonticamente com periodontite apical crônica. Para o qual foram utilizados 40 pacientes com periodontite apical crônica, divididos em 2 grupos. No grupo A o canal permaneceu com hidróxido de cálcio de 10 a 14 dias após acesso cavitário e limpeza e no grupo B o canal foi irrigado com IKI por 5 minutos, após acesso cavitário e limpeza, seguido pela obturação do canal com gutta percha e sealer. Foram isolados micróbios em 33 dos 40 dentes incluídos no estudo. O fermento foi encontrado em 6 dentes, sempre associado a bactérias, 50% com *E. faecalis* e 50% com outras bactérias. Nenhuma diferença principal pôde ser detectada em diferentes diâmetros de lesões entre os diferentes grupos. A análise e a comparação fenotípica detalhada com tensões da referência de outros *Enterococcus spp*, revelaram que todos os

Enterococcus isolados pertenciam à espécie *faecalis*. Os resultados desse estudo sugerem a utilização de IKI para conseguir sucesso durante a retirada, quando usados após a instrumentação e a irrigação do canal com hipoclorito de sódio.

Molander et al (2002) realizaram um protocolo para detecção da reação em cadeia da polimerase do *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium* no canal radicular, utilizando tensões bacterianas de perfis idênticos *E. faecalis* (ATCC 19433, CCUG19916) e *E. faecium* (ATCC19434, CCUG542). Além desses, outros quatro perfis foram isolados do *E. faecalis* (OMGS349/98, OMGS 350/98,OMGS 367/98, OMGS1/97), transferidos por meio da solução de amostragem do estágio liofilizado em placas de Agar com sangue para incubação durante a noite em 37°C. O DNA foi preparado diretamente das culturas ‘frescas’ e das tensões e manteve-se congelado. Todas as tensões de perfis idênticos de amplificação do *E. faecalis* e *E. faecium* produzem duas faixas principais na posição que corresponde a 320 e 420 pares de base. Quando a amplificação do DNA preparado tem pureza mais elevada, a diluição de série do *E. faecalis* usando PROMEGA torna a terceira banda com 600 pares de base evidente. Embora os *Enterococcus* crescessem facilmente em meios seletivos, a PCR pode ser a tecnologia ligeiramente superior a respeito do nível de detecção. Entretanto as vantagens de cultivar excedente de PCR, sobretudo, são associadas com sua sensibilidade baixa ao exame e a influência química.

Evans et al (2002) avaliaram os mecanismos envolvidos na resistência do *E. faecalis* ao hidróxido de cálcio e descobriram que a principal causa da falha do tratamento de canal é a persistência dos microrganismos na porção apical do dente tratado endodonticamente. Diversos estudos relatam que dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais persistem em abrigar uma ou algumas espécies bacterianas e que as Gram-positivas dominam a flora bacteriana. O *Enterococcus faecalis* foi recuperado em uma proporção elevada de falhas endodônticas, aproximadamente de 1/3 dos canais de dentes tratados com lesões periapicais. Provou ser difícil a erradicação do *E. faecalis* durante o retratamento. Uma vez estabelecido o *E. faecalis* no canal da raiz, diversos desafios são enfrentados, incluindo uma habilidade de suportar os agentes antimicrobianos usados durante o tratamento e a resistência à limpeza e obturação do canal. O *E. faecalis* se mostrou resistente a uma concentração de hipoclorito de sódio de 0,005%

quando a uma exposição por 30 min. O pré-tratamento com hidróxido de cálcio a 0,0001% ou hipoclorito de sódio com pH 10,3 por 30 minutos não induziu tolerância nem aumentou a sobrevivência. O pré-tratamento com hidróxido de cálcio pH 10,3 por 30 minutos conferenciou nenhuma resistência pelo *E. Faecalis* a uma exposição adicional ao hidróxido de cálcio. No entanto, não houve nenhuma diferença na sobrevivência da célula quando usado um inibidor de síntese enzimática, o cloranfenicol. O inibidor da bomba de próton CCCP mostrou que este também não era letal sobre o *E. faecalis* em pH 7.0, e seu efeito era aparentemente dependente do tempo, pois apesar do efeito ter sido o mesmo, o tempo pronunciado era de mais de 60 minutos.

Pinheiro et al (2003) realizaram um estudo no qual foram analisados microrganismos de canais de dentes tratados endodonticamente com lesões periapicais. Foram utilizados dentes com restaurações prévias e tratados endodonticamente que através de radiografias mostravam periodontite apical. Cerca de 90% dos dentes, possuíam canais tratados há mais de 4 anos e em 6 casos, os dentes tinham sido obturados há mais de 2 anos. As restaurações defeituosas ou cáries foram removidas, e em seguida foram feitos o isolamento com lençol de borracha do referido dente, o acesso à cavidade e a desinfecção com hipoclorito de sódio a 5,25%. A solução foi inativada com tiosulfato de sódio a 5%. Caso o dente fosse multirradicular, o canal selecionado como amostra seria o canal mais largo. A obturação foi removida com brocas Gattes Gliden e limas endodônticas sem o uso de solventes. Utilizou-se solução salina estéril pra remover qualquer resquício e para umedecer o canal. Para a amostragem microbiana utilizou-se um cone de papel estéril que foi mantido no comprimento do dente por 60 segundos, e em caso do uso de solução salina, usou-se quantos cones foram necessários para promover a absorção de todo o líquido do canal. Os cones foram transportados com VMGA III, para o laboratório de microbiologia. Dos dentes analisados, 47 tiram raiz única e 13 múltiplas raízes. A obturação de cone de guta percha estava presente em todos os dentes. 108 culturas isoladas, pertencentes a 37 espécies diferentes foram recuperadas do 60 canais examinados. Nove canais (15%) não tinham bactérias cultiváveis; 28 canais (46,7%) apresentavam um único microrganismo, e em 18 deles, o *Enterococcus faecalis* foi o único microrganismo isolado; 8 canais (13,3%) apresentavam 2 espécies e 15 canais (25%) apresentavam polimicrobianos, consistindo de 3 ou mais espécies por canal. O *Enterococcus faecalis* foi a espécie bacteriana mais freqüentemente recuperada, sendo encontrada em 27 (52,94%), dos canais com bactéria, sendo 18 vezes em cultura pura. Esta

descoberta concorda com aquela relatada por Molander et al (1998) e Sundqvist et al (1998) que respectivamente encontraram *E. faecalis* em 47 e 38% de canais previamente tratados com culturas positivas. Peciulienė et al (2001) relataram uma frequência de isolamento mais alta destes microrganismos, 70 e 64% , respectivamente. O *E. faecalis* demonstrou capacidade de sobreviver em ambientes na qual há escassos nutrientes disponíveis, nos quais a comensabilidade com outras bactérias é mínima. (SUDQVIST et al, 1998). No entanto, a flora dos canais com falha de tratamento de canal compreendeu um número limitado de espécies microbianas Gram-positivas anaeróbicas facultativas, e especialmente *E. faecalis* foram os microrganismos mais comumente isolados dos dentes. As infecções polimicrobianas e anaeróbicas obrigatórias foram frequentemente encontradas em canais de dentes sintomáticos obturados.

Rôças et al (2004) realizaram um estudo sobre a associação do *Enterococcus faecalis* com diferentes formas de doenças periodontais. Foram utilizadas amostras do canal radicular de pacientes adultos com tratamento de canal radicular e as amostras de pus dos abscessos foram obtidas de pacientes adultos, consultados para o tratamento de emergência. As amostras foram divididas em caixas **a,b,c,d**; Caixa **a**: dentes sem tratamento com lesão periradicular crônica assintomática; Caixa **b**: diagnosticada como periodontite apical aguda, com dor exacerbada pela mastigação; Caixa **c**: diagnosticada como abscesso periradicular agudo, com aumento localizado, febre e linfadenopatia; Caixa **d**: dentes tratados endodonticamente associados com lesão periradicular crônica assintomática. Os resultados revelaram estatisticamente que o *E. faecalis* esteve significativamente mais associado com casos assintomáticos de infecções endodônticas primárias do que com as sintomáticas.

Kishen et al (2005) avaliaram o papel de mudanças ambientais em mono espécie na formação do biofilme na parede do canal pelos *Enterococcus faecalis* e observaram no crescimento do biofilme uma estratégia de sobrevivência em condições ásperas. Neste estudo avaliou-se o efeito de condições diferentes do crescimento nas características do biofilme do *E. faecalis* no canal, e a penetração do *E. faecalis* em túbulos dentinários. A microanálise de EDX mostrou um aumento significativo nos níveis do cálcio (Ca) nas estruturas do biofilme dado forma sob a circunstância nutriente-privada anaeróbica. A profundidade da penetração bacteriana era significativamente maior em condições ricas de nutrientes. No exame de LCSM, observou-se

que a morfologia do biofilme bacteriano desenvolvido sob circunstâncias aeróbicas e anaeróbicas era similar. Este estudo foi conduzido para avaliar a habilidade do *E. faecalis* de desenvolver o biofilme sob circunstâncias aeróbicas, anaeróbicas, ricas em nutrientes e privadas de nutrientes. Em resumo, este estudo in vitro destacou a resposta do *E. faecalis* no microambiente do canal da raiz. Estas experiências mostraram que o desenvolvimento e a modificação do biofilme do *E. faecalis* no canal da raiz e sua penetração nos túbulos dentinários foram modulados pela prevalência das circunstâncias ambientais.

Sedgley et al (2006) analisaram a prevalência do *E. faecalis* em múltiplos sítios orais de pacientes com tratamento endodôntico usando cultura e PCR e verificaram que sua prevalência depende do local da amostragem, e que o PCR é mais sensível do que a cultura microbiológica, obtendo a prevalência do *E. faecalis* em 10% na cavidade oral, 10% no interior do canal, 42% na língua e 14% no sulco gengival.

Chai et al (2007) realizaram estudo sobre a eficácia antimicrobiana de antibióticos sobre o *Enterococcus faecalis*. Um biofilme de *E. faecalis* foi exposto por uma hora aos grupos de antibióticos ampicilina, cotrimoxazol, eritromicina, oxitetraciclina, vancomicina e vancomicina seguida de gentamicina, e também ao hidróxido de cálcio. Após a exposição, foi executada a contagem de bactérias remanescentes, e os resultados mostraram que somente a eritromicina, a oxitetraciclina e o hidróxido de cálcio tiveram efeito bactericida sobre 100% do biofilme, enquanto a ampicilina, o cotrimoxazol, a vancomicina e a vancomicina seguida de gentamicina foram ineficazes contra o *E. faecalis*.

Stuart et al (2006) avaliaram a falha do tratamento de canal com a presença do *E. faecalis* e os atuais métodos para sua erradicação e concluíram que a associação de uma boa técnica asséptica, o alargamento apical do canal e o uso de materiais como a clorexedina a 2% combinada com hipoclorito de sódio é o método mais eficiente no combate ao *E. faecalis*.

2.2. Metodologia

Para o desenvolvimento do presente trabalho, foram selecionados 60 pacientes atendidos na Clínica de Odontologia da Universidade do Sagrado Coração, Bauru-SP. O exame foi realizado na Clínica de Odontologia, utilizando o aparelho de iluminação do equipo, espelho e sonda exploradora estéril. Foram selecionados 30 pacientes com boa higiene bucal, ou seja, que não apresentassem placa bacteriana, cálculo dental, sem dentes tratados endodonticamente; e 30 pacientes com má higiene bucal, ou seja, que apresentassem placa bacteriana, cálculo dental, dentes tratados endodonticamente e dentes com indicação de extração por doença periodontal ou por cárie. Esses pacientes foram identificados por número sem marcar seu nome para que este não fosse divulgado.

Para coleta das amostras clínicas, uma zaragatoa de algodão estéril foi friccionada sobre a região lingual, a superfície dos dentes e em regiões de concentração de saliva, que foi colocada posteriormente em um ependorfe, e transportada de forma hermeticamente fechada ao laboratório de microbiologia da Universidade do Sagrado Coração.

2.2.1 Extração de DNA

Ao criotubo da amostra foi acrescentado 100 ml de TAS (10 mM TRIS HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA; 10 mM NaCl); 10 ml de SDS 10% (sodium dodecyl sulfate) e 2 ml de Proteinase K (20 mg/ml), agitado para mistura dos reagentes e deixado em banho-maria por 3 minutos.

Posteriormente, foi acrescentado 50 ml de Fenol e 50 ml de Clorofórmio, centrifugado (centrífuga Fanem, modelo 243) por 3 minutos a 10.000 rpm (rotações por minuto), e retirado o sobrenadante. Ao sobrenadante acrescentou-se 50 ml de clorofórmio, agitado e novamente centrifugado. Este procedimento foi repetido por duas vezes.

Ao sobrenadante total obtido acrescentou-se acetato de sódio (3 M) e etanol 100% e deixado a 4°C “over night”. Posteriormente foi centrifugado (10 minutos a 10.000 rpm) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi desidratado em estufa a 37°C por 5 minutos (Estufa

de Cultura, modelo 002 CB – Fanem). Ao material seco acrescentou-se T.E. (10 mM TRIS-HCl pH 8.0; 1 mM EDTA, pH 8.0) e armazenou-se em geladeira para posterior análise.

2.2.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Em um tubo (eppendorf) foi adicionado uma quantidade muito pequena de DNA genômico (2 ml da amostra previamente extraída e armazenada na geladeira), os quatro nucleotídeos que compõem a cadeia de DNA (dCTP, dATP, dGTP e dTTP), a enzima polimerase do DNA, os oligonucleotídeos que serviram de “primers” (5´GTT TAT GCC GCA TGG CAT AAG AG 3´ / 5´CCG TCA GGG GAC GTT CAG 3´) e a solução tampão [10 X PCR buffer (500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 100 mM TRIS HCl, pH 9.0)], que forneceu as condições de pH e salinidade para que a síntese fosse processada. O tubo (eppendorf) foi submetido a alta temperatura em um termociclador (geralmente 94°C por 5 minutos), para provocar o rompimento das pontes de hidrogênio entre ambas as cadeias de DNA e causar a desnaturação da molécula. A temperatura foi rebaixada para 30 a 65°C por 30 segundos quando, então, os primers puderam se anelar às suas seqüências complementares no DNA genômico. Finalmente, a temperatura foi elevada para 72°C (por 2 a 5 minutos), temperatura ideal para que a polimerase do DNA utilizada na reação atuasse, dirigindo a síntese de novas cadeias. Repetindo-se esses passos, *desnaturação, anelamento e síntese*, por cerca de 30 ciclos, foram produzidos milhões de cópias de uma determinada seqüência de DNA em fita dupla, uma vez que o número de cópias cresce de modo exponencial a cada ciclo. Ao término dos ciclos o material foi mantido a –20°C até a leitura em gel de eletroforese.

2.2.3 Eletroforese

A eletroforese em gel de agarose é uma forma simples e rápida para separar e visualizar fragmentos de DNA. O DNA, quando submetido a um campo elétrico, em pH neutro, tem suas moléculas atraídas para o pólo positivo (ânodo) e repelidas do pólo negativo (cátodo). Quando a migração do DNA é realizada em uma matriz que apresenta alguma resistência à migração das moléculas, os fragmentos menores podem se mover através da matriz com maior facilidade do

que os fragmentos grandes. Uma matriz feita em agarose (tipo II – Sigma – material semelhante a uma gelatina purificada) possui um tamanho de poros que permite a separação de fragmentos que variam de 200 pares de base (pb) até 50 Kilobase (kb), desde que se ajuste à concentração do gel. Quando o gel tem baixa concentração de agarose (0,3% ou menos), a resistência gerada à migração da molécula de DNA será pequena e, portanto, fragmentos em uma faixa maior de tamanho podem ser eficientemente separados. Entretanto, para a separação satisfatória dos fragmentos menores, é necessário aumentar a concentração de agarose no gel (1.5 a 2%).

A preparação do gel de agarose para a eletroforese consiste em dissolver a agarose na concentração desejada e aquecer até a completa dissolução da agarose. Antes da solidificação do gel em recipiente apropriado, foi introduzido um pedaço de plástico denteado (pente) para formar orifícios, que não chegaram a atravessar o gel, no qual as amostras de DNA foram depositadas. Quando o gel tornou-se sólido, foi mergulhado em uma cuba para eletroforese com uma solução tampão (TAE 1 X) de pH neutro. A corrente elétrica foi transmitida ao longo da cuba pelos íons do tampão, produzindo um campo elétrico que provocou a migração do DNA por meio do gel de agarose.

A migração das amostras de DNA foi efetuada durante uma hora. Ao gel foi acrescida solução de brometo de etídio (corante – moléculas do brometo de etídio intercalarão-se entre os nucleotídeos na dupla hélice do DNA), que permitiu a observação sob luz ultravioleta dos fragmentos presentes no gel.

Paralelamente às amostras de DNA da bactéria colocou-se no mesmo gel amostra de DNA que evidenciasse, na eletroforese, fragmentos de tamanhos conhecidos, os quais serviram como pontos de referência e então, verificou-se a positividade ou negatividade da presença do microrganismo na coleta daquele frasco.

Os resultados foram confrontados estatisticamente quanto a presença ou ausência do microrganismo em função da higienização do paciente pelo teste exato de Fisher.

2.3 Resultados

Na figura 1, encontram-se as cepas de *Enterococcus faecalis* referente às amostras 37,38,39,40,41,42,43 e 44.

Na tabela 1 encontra-se o número de pacientes com boa e má higiene, com presença e ausência de *Enterococcus faecalis*.

Na figura 2, encontra-se a porcentagem de pacientes com presença de *Enterococcus faecalis* em ambas as condições. Pacientes com boa higiene que apresentaram *E. faecalis* na cavidade bucal correspondem a 3,33% e pacientes com má higiene que apresentaram *E. faecalis* na cavidade bucal correspondem a 23,33%.



Figura 1: Cepas 37,38,39,40,41,42,43,44 ladder

	Presença	Ausência	Total
Boa higiene	1	29	30
Má higiene	7	23	30

Tabela 1 – Número de pacientes com boa e má higiene com presença e ausência de *Enterococcus faecalis*

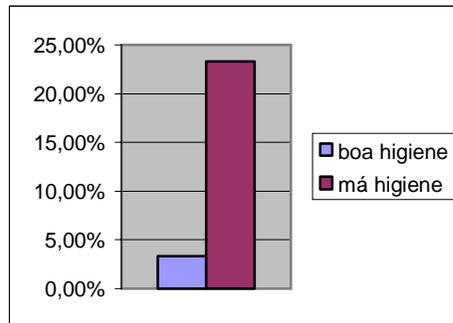


Figura 2 – Representação gráfica da porcentagem de pacientes com boa e má higiene que apresentaram *Enterococcus faecalis*.

No confronto estatístico, pelo teste de Fisher constatou-se diferença significativa quanto à presença de *Enterococcus faecalis* entre os pacientes com boa e má higiene ($p < 0,05$).

3. Discussão

3.1. Da Metodologia

Para o desenvolvimento do presente trabalho foram utilizados na coleta das amostras clínicas uma zaragatoa de algodão estéril a qual foi friccionada na superfície oclusal, vestibular e lingual dos dentes, fundo de vestibulo e soalho de boca, palato, mucosa jugal e por último sobre o dorso da língua. Não houve seleção se sítios específicos. Posteriormente, a zaragatoa foi colocada em um endorfe, o qual foi utilizado para o transporte de forma hermeticamente fechada ao Laboratório de Microbiologia da Universidade do Sagrado Coração.

O *E. faecalis* é resistente a sais de bile, detergentes, etanol e metais pesados, crescem na escala de 10 a 35° C e sobrevive a uma temperatura de 60° C por 30 minutos (GILMORE, 2002). A prevalência de *E. Faecalis* é aumentada em amostras de pacientes que receberam tratamento endodôntico inicial em relação aqueles que estavam no meio do tratamento e aos que terminaram o tratamento endodôntico, comparados com pacientes que nunca tiveram história endodônticas, relatando que o *E. faecalis* é um habitante normal da cidade bucal. (SEDGLEY et al 2004).

Rôças et al (2004) associaram o *E. faecalis* com diferentes formulários de doenças periradiculares, incluindo infecções endodônticas primárias e infecções persistentes, sendo que na categoria de infecções endodônticas primárias os *E. faecalis* estão associado às lesões periradiculares crônicas assintomáticas mais freqüentemente do que em periodontite periradicular crônica ou abscesso periradicular crônico. O *E. faecalis* está presente de 4 a 40% em infecções endodônticas primárias.

O alvo do estudo de Sedgley et al (2006) era investigar o *E. faecalis* em amostras orais multilocais de pacientes com tratamento endodôntico. Especificamente, as amostras coletadas de quatro locais diferentes (cavidade oral, língua, sulco gengival, e canal radicular) foram analisadas para a presença de *E. faecalis* pelo PCR, paralelamente com cultura microbiológica. As hipóteses foram testadas, e depois disso foi visto que: (a) a prevalência do *E. faecalis* oral é dependente do local da amostragem, e (b) PCR é mais sensível do que a cultura microbiológica na detecção do

E. faecalis oral. As associações potenciais entre características clínicas presentes e a ocorrência do *E. faecalis* oral foram estudadas também. Além da virulência, o fenótipo, e o genótipo de tensões de culturas do *E. faecalis* foram investigados. Na língua o *E. faecalis* estava presente em 42%, no sulco gengival em 14%, cavidade oral em 10% e no canal radicular em 10%.

O método de PCR é uma amplificação de DNA sem o uso de um organismo vivo, ou seja, o PCR pode ter início com uma quantidade muito pequena de DNA original, ou até mesmo, com um DNA deixado em uma impressão. Durante o processo PCR, o DNA original é copiado por uma enzima, chamada DNA polimerase, que duplica a cadeia de DNA. Geralmente, só uma pequena parte da cadeia de DNA é copiada usando PCR. Esta parte é selecionada por iniciadores (*primers*), curtas cadeias artificiais de DNA (20-40 pares de bases), que se combinam exatamente com cada região terminal da parte a ser copiada. Além do DNA original (que vai servir de base para providenciar as cópias), dos iniciadores e da polimerase, é ainda necessária a presença de desoxirribonucleótidos - as unidades básicas da cadeia de DNA.

A máquina do PCR possui um programa que controla o tempo e a temperatura. O processo de PCR consiste em várias interações, geralmente de 15 a 30 ciclos e cada interação é composta pelos seguintes passos:

Desnaturação: Durante a desnaturação, a cadeia dupla do DNA é separada em duas cadeias simples, da mesma forma que se abre um "fecho-éclair". A DNA polimerase é estável a altas temperaturas, pois é obtida de organismos que vivem em ambientes extremos (extremófilos).

Anelamento: Durante o anelamento, os iniciadores ligam-se ao DNA de cadeia simples e a DNA polimerase liga-se aos iniciadores emparelhados.

Síntese: Durante a síntese, a DNA polimerase cria a cadeia de DNA complementar à medida que percorre o DNA de cadeia simples, incorporando desoxirribonucleótidos presentes na reação.

Ao término dos ciclos o material foi mantido a -20°C até a leitura em gel de eletroforese.

Neste trabalho, o PCR foi eleito como meio para verificar a presença da bactéria *Enterococcus faecalis*, pois se no momento da coleta, a bactéria não se encontrava presente, mas por algum momento ela esteve presente na cavidade bucal, com análise em PCR pôde ser possível essa detecção, pois seu DNA estará presente na cavidade bucal, diferente da análise em cultura, na qual só é possível a detecção da bactéria se a mesma se encontra viva no interior da cavidade bucal. O PCR é atualmente o método predileto para a detecção do *E faecalis* (MOLANDER et al 2002). Este método prova ser mais rápido, mais sensível e mais exato (SIQUEIRA et al 2003).

O método de PCR alveja o DNA livre flutuante e o DNA não viável, viável mas não cultivável (VBNC), além das pilhas viáveis e cultiváveis. No contraste, os métodos baseados em cultura da identificação requerem as pilhas viáveis (KISHEN et al 2004). A aplicação dos métodos que alvejam o gene a expressão em amostras orais pôde melhorar o alvo VBNC (PAPAPANOU et al 2004),

Deve-se ressaltar que com o método PCR consegue-se evidenciar microrganismos que já estiveram na área e por algum motivo não se encontram mais, ou se encontram confinados em pequenos números.

Já na cultura, o microrganismo tem que estar viável e há o risco na cultura de não conseguir recuperar o microrganismo, podendo apresentar resultados falso - negativo ou de perdê-lo durante o transporte.

Portanto, para os trabalhos em que se quer evidenciar se um determinado microrganismo está ou esteve presente, o método PCR é mais confiável e apresenta maior poder de identificação (SEDGLEY et al 2006), devendo para estas situações ser o preferido.

3.2 Dos resultados

Através do presente estudo, foi possível observar que entre os pacientes selecionados com boa higiene, em apenas um foi encontrado *E. faecalis* na cavidade oral, mostrando uma porcentagem de 3,33%. Comparando com os pacientes selecionados com má higiene, o número de pacientes que apresentaram a bactéria no interior da cavidade bucal aumentou em 20%, ou seja, foi encontrado em 7 pacientes, representando então 23,3%, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

A presença de *Enterococcus* na cavidade bucal está relacionada à má higiene do paciente, pois no presente estudo, observou-se que dos 60 pacientes selecionados, sete pacientes dos 30 com má higiene apresentava no interior da cavidade bucal o *E. faecalis* (23,3%), enquanto apenas um paciente (3,33%) entre os 30 com boa higiene apresentava o *E. faecalis*, bactéria essa presente no trato gastrintestinal e no trato genital feminino, sendo que o próprio paciente é portador da bactéria e se auto – infecta, por meio do uso do sanitário e posteriormente escovação dos dentes, sem ao menos executar a lavagem das mãos ou abaixar a tampa do vaso, e também pela não lavagem da mão antes das refeições.

No presente trabalho a zaragatoa foi friccionada em diferentes pontos da cavidade bucal, porém sem se preocupar em demarcar a área específica com zaragotas diferentes. Sedgley et al (2006) analisando a presença de *Enterococcus faecalis* em pacientes e em diferentes sítios, encontraram-no em 68% dos pacientes com canais tratados. Computando o número de pacientes totais, o presente trabalho encontrou-o em 13% do total de pacientes. A diferença pode estar relacionada, provavelmente, à forma de coleta ou, talvez, os pacientes do trabalho de Sedgley et al (2006) tivessem higiene, já que o autor não se preocupou com isto. O sítio com maior prevalência de *Enterococcus faecalis* ocorreu na língua e a menor no interior do canal radicular.

O risco do *Enterococcus faecalis* estar presente na cavidade bucal é o dele poder contaminar o canal radicular quando este dente estiver aberto ao meio bucal ou caso o canal já esteja tratado e não tenha se executado uma restauração definitiva adequada. No trabalho de Sedgley et al (2006), os autores que apesar de encontrar *Enterococcus faecalis* na cavidade bucal

em 68%, apenas 5% dos pacientes apresentaram o microrganismo no interior do canal radicular.

O *Enterococcus faecalis* tem se mostrado um microrganismo resistente ao tratamento endodôntico, visto que ele está presente em 64% dos fracassos endodônticos. Este fato pode ser atribuído ao fato deste microrganismo apresentar resistência a alguns medicamentos endodônticos.

O hidróxido de cálcio, medicamento geralmente usado intracanal, se mostrou ineficaz para a destruição do *E. faecalis*, principalmente quando o pH elevado não é mantido (HAAPASOLO et al 1987, LIN et al 2003 e TRONSTAD et al 1981). O *E. faecalis* sobrevive ao tratamento com hidróxido de cálcio, pois: a) O *E. faecalis* se mantém passivo a homeostase do pH. Isto ocorre em consequência dos íons que penetram na membrana das células bem como da capacidade de tamponamento do citoplasma. (b) O *E. faecalis* tem uma bomba de próton que fornece meio adicional para manter a homeostase do pH. Isto é realizado por prótons “bombeando” na célula para abaixar o pH interno. (c) Em um pH de 11.5 ou maior, o *E. faecalis* é incapaz de sobreviver (EVANS et al 2002).

Card et al (2002) analisaram que uma boa técnica de assepsia associada com o aumento do diâmetro do preparo apical ajuda a eliminar microrganismos intracanal, pelas áreas normalmente não alcançadas pelas limas menores. A clorexedina a 2% combinada com hipoclorito de sódio é, atualmente o método mais eficaz para combater o *E. faecalis*, uma vez que a prevalência do *E. faecalis* em infecções endodônticas persistentes varia de 24 a 77% (STUART et al 2006).

Além do aumento do diâmetro nos preparos apicais facilitarem a remoção da dentina, também favorece o potencial de remover as bactérias intratubulares e abrir os túbulos dentinários para permitir que os antimicrobianos penetrem mais eficazmente. Hipoclorito de sódio a 3%, se usado em quantidades adequadas e trocado regularmente, têm a potencialidade para destruir o *E. faecalis* no canal radicular (SIQUEIRA et al 1997). O hipoclorito do sódio é um irrigante eficaz para todas as apresentações do *E. faecalis* incluindo sua existência como um biofilme (ABDULLAH et al 2005).

Em um estudo, uma combinação do hidróxido de cálcio com o paramonoclorofenol canforado eliminou completamente *E. faecalis* dentro dos túbulos dentinários (SUKAWAT et al 2002). Portanto, associações devem ser feitas ao curativo de hidróxido de cálcio nos casos de suspeita de presença de *Enterococcus faecalis*.

Um estudo de Ravazi et al (2007) revela que é possível a contaminação transitória da cavidade bucal sadia pelo *E. faecalis* presente em alimentos. Para esse estudo foram selecionados 50 estudantes de odontologia com boa higiene bucal e com ausência de *E. faecalis* na cavidade bucal. Eles ingeriram amostras de queijos Suíço, Feta (produzido com leite de ovelha), Mussarela e Branco, cada uma com diferentes quantidades de *E. faecalis* em sua composição, sendo o queijo Branco o mais rico *E. faecalis*. Amostras de saliva foram coletadas antes da ingestão do queijo, e um, dez e cem minutos após a ingestão. Os resultados mostraram que após um e dez minutos da ingestão, as amostras de saliva apresentaram o *E. faecalis* em número decrescente, respectivamente; porém após cem minutos da ingestão nenhuma amostra de saliva apresentou *E. faecalis* viáveis, apesar da presença destes em pelo menos uma das cinco marcas comerciais de cada tipo de queijo. Essa contaminação transitória pode explicar a presença de *E. faecalis* em indivíduos com boa higiene bucal, como encontrado no presente trabalho; porém, ainda é necessária a realização de estudos adicionais para verificar os fatores de virulência dos *Enterococcus* presentes em alimentos, que favorecem a colonização da cavidade bucal pelos mesmos.

No entanto, o presente trabalho, vem chamar a atenção sobre os risco de deixar dentes abertos e de se realizar restaurações mal feitas, principalmente em pacientes com má higiene.

Nestes casos, se o paciente necessitar do retratamento endodôntico deve-se suspeitar do *E. faecalis*.

4. Conclusão

Dentro das limitações do presente estudo foi permissível concluir que:

- a) Treze por cento do total de pacientes apresentaram *Enterococcus faecalis* na cavidade bucal.
- b) Pacientes com má higiene apresentaram significativamente ($p < 0,05$) presença de *Enterococcus faecalis* na cavidade bucal do que pacientes com boa higiene.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, M. et al. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. **J. Endod**, v. 31, n. 1, p. 30-36, Jan. 2005.

CARD, S.J. et al. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. **J. Endod**, v. 28, n. 11, p. 779-783, Nov. 2002.

CHAI, W. L., et al. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. **Journal of Oral Science**, Vol. 49, No. 2, 161-166, Jun. 2007.

EVANS, M. et al. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. **Int.Endod. J.**, v.35, n.3, p.221-8, Mar. 2002.

GILMORE, M.S.; SHEPARD, BD. Antibiotic-resistant enterococci: the mechanisms and dynamics of drug introduction and resistance. **Microbes Infect**, v. 4, n. 2, p. 215-224, Feb. 2002.

HAAPASOLO, M.; RANTA, K.; RANTA, H. Mixed anaerobic periapical infection with sinus tract. **Dental Traumatology**, v. 3, n. 2, p. 83-85, April 1987.

KISHEN, A. et al. Chairside sensor for rapid monitoring of *Enterococcus faecalis* activity. **J. Endod**, v. 30, n. 12, p. 872-875, Dez. 2004.

KISHEN, A.; GEORGE, S; SONG, K.P. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by *Enterococcus faecalis*. **J. Endod.** v.31, n.12, p.867- 872, Dec.2005.

LIN, Y-H.; MICKEL, A.K.; CHOGLLE, S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus Faecalis*: Part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus Faecalis*. **J. Endod**, v. 29, n. 9, p. 565-566, Sep. 2003.

MOLANDER, A.; et al. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v.31, n.1, p. 1-7, Jan. 1998.

MOLANDER, A. et al. A protocol for polymerase chain reaction in the detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from root canal. **Int. Endod. J.**, v.35, n.1, p.1-6, Jan. 2002.

PAPAPANOU, P.N. et al. Gene expression signatures in cronic aggressive periodontitis: a pilot study. **Eur J Oral Sci**, v. 112, n. 3, p. 216-223, Jun 2004.

PECIULIENE, V. et al. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v.34, n.6, p.429-34, Sept. 2001.

PINHEIRO, E.T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int. Endod. J.**, v.36, n.1, p.1-11, Jan. 2003.

RAZAVI, A. et al. Recovery of *Enterococcus faecalis* from cheese in the oral cavity of healty subjects. **Oral Microbiology and Immunology**, v.22, 248-251, Jan. 2007.

RÔÇAS, I.N.; SIQUEIRA JR, J.F.; SANTOS, K.R.N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. **J. Endod.**, v.30, n.5, p.315-20, May 2004.

SEDGLEY, C.M.; LENNAN, S.L.; CLEWELL, D.B. Prevalence, phenotype and genotype of oral Enterococci. **Oral Microbiology and Immunology**, v.19, n.4, p. 95-101, April 1998.

SEDGLEY, C.; BUCK, G.; APPELBE, O. Prevalence of *Enterococcus faecalis* at Multiple Oral Sites in Endodontic Patients Using Culture and PCR. **J.Endod.**v.32, n.2, p.104-109, Feb.2006.

SIQUEIRA JR, J.F. et al. Evaluation of effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. **Int. Endod. J.**, v. 30, n.4, p. 279-282, July 1997.

SIQUEIRA JR, J.F. Microbial causes of endodontics flare-ups. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 7, p. 453-463, July 2003.

STUART, C.H. et al. *Enterococcus faecalis*: Its Role In Root Canal Treatment Failure And Current Concepts In Retreatment. **J. Endod.**, v.32,n.2, p.93-98, Feb.2006.

SUKAWAT, C.; SRISUWAN, T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. **J. Endod**, v. 28, n. 2, p. 102-104, Feb. 2002.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, n.1, p.85-93, Jan.1998.

TRONSTAD, M. et al. pH changes in dental tissues after root filling with calcium hydroxide. **J. Endod**, v. 7, n. 1, p. 17-21, Jan. 1981.

UREÑA, J. L. **Microbiología oral**. Interamericana.McGraw, Madrid, 1995.

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

CALDWELL, D. R. **Microbial physiology & Metabolism.** Win . C. Brown Publisher, Dubuque, 1995.

NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. **Oral microbiology and Immunology.** 2 ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1994.