

SUSCEPTIBILIDADE A β -LACTÂMICOS DE BACTÉRIAS ANAERÓBIAS ISOLADAS DE INFECÇÕES PERIIMPLANTARES E PERIODONTAIS

Susceptibility to β -lactams of anaerobic bacteria isolated from periimplantar and periodontal infections

Elerson Gaetti-Jardim Jr*
Ellen Cristina Gaetti-Jardim**
Samira Âmbar Lins***
Sergio Ricardo Oliveira****
Alex Semenov Segundo****

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a susceptibilidade de microrganismos isolados de infecções periodontais e periimplantares aos β -lactâmicos. Foram testadas as seguintes drogas antimicrobianas: amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina, imipenem e penicilina G. Um total de 187 isolados de bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas foram submetidos aos testes de susceptibilidade. O inóculo bacteriano foi padronizado em 10^5 células/botão, o qual foi transferido para as placas contendo os antimicrobianos e placas controle (sem droga) através de um replicador de Steers (Cefar Ltda, São Paulo, Brazil). Os resultados evidenciaram que a resistência à amoxicilina e penicilina G são mais disseminadas entre os microrganismos isolados, sendo que a cefoxitina e a associação amoxicilina/ácido clavulânico mostraram maior efetividade.

UNITERMOS

Microbiologia, Periodontia, Antibióticos

INTRODUÇÃO

As doenças periodontais (Van Winkelhoff & Winkel¹⁸ 2005), e periimplantares (Van Winkelhoff *et al*¹⁷ 2000), representam a inter-relação entre a presença de um conjunto específico de microrganismos capazes de expressar fatores de virulência e a capacidade de defesa do hospedeiro, que se faz presente nos tecidos bucais por meio de elementos específicos, como a produção de imunoglobulinas, e inespecíficos como a atividade de enzimas salivares, componentes do sistema complemento, entre outros. No desenvolvimento dessas doenças infecciosas, é de relevância o papel desempenhado por grupos microbianos específicos, merecendo destaque os anaeróbios obrigatórios Gram-negativos e outros como o *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, um anaeróbio facultativo que se desenvolve melhor em condições de microaerofilia.

O controle e prevenção das infecções periimplantares e periodontais depende em grande parte do controle do biofilme microbiano, por meio de medidas pessoais de higiene e tratamento mecânico local. Contudo, em pacientes com periodontite avançada ou agressiva (Dörfer² 2003; Jorgensen *et al*⁶ 2005), além das infecções

periimplantares (Monbelli *et al*¹⁰ 2001; Heitz-Mayfield & Lang⁴ 2004), por vezes a utilização concomitante de antimicrobianos sistêmicos ou tópicos pode colaborar para a resolução da condição patológica ou pelo menos colaborar no controle do processo infeccioso (Heitz-Mayfield & Lang⁴ 2004), embora, principalmente em Implantodontia, existam controvérsias sobre a existência desses benefícios (Roos-Jansäker *et al*¹⁵ 2003).

Como a ampla maioria dos microrganismos isolados de infecções periimplantares e periodontais são anoxibiontes (Van Winkelhoff & Winkel¹⁸ 2005), procedimentos de cultura e antibiograma para os mesmos não constituem rotina, deixando o clínico apenas com padrões de susceptibilidade a drogas descritas na literatura estrangeira, aos quais não se assemelham com os padrões nacionais de susceptibilidade a drogas, visto que em nosso país a problemática da automedicação é muito mais séria do que a apresentada por países desenvolvidos (Nakano & Ávila-Campos¹¹ 2004).

Assim, foi objetivo desse estudo avaliar a susceptibilidade a β -lactâmicos de bactérias isoladas de pacientes com periodontite crônica, periodontite agressiva localizada, e generalizada e de

* Professor Livre Docente Adjunto – Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

** Graduada - Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

*** Professora Assistente – Faculdades Integradas de Santa Fé do Sul (FISA-FUNEC), Professora convidada da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

**** Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Área de Periodontia - Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

pacientes com infecções periimplantares.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismos

Os cones de papel absorvente estéreis, nº 40 (Tannari), foram inseridos em sítios periodontais que apresentavam sinais clínicos de inflamação e profundidade clínica de sondagem maior ou igual a 5mm, onde permaneceram por 30 segundos, conforme metodologia utilizada por (Gaetti-Jardim Jr. et al.³ 1996), sendo transferidos para meio de transporte VMGA III e submetidos à diluição seriada em VMG I e inoculados em: a) ágar Fastidious Anaerobe (FAA) enriquecido com extrato de levedura (0,5%), hemina (5 µg/mL), menadiona (1 µg/mL) e 5% de sangue desfibrinado de cavalo; b) ágar Cristal Violeta Eritromicina (ágar CVE); c) ágar TSBV; d) ágar Fastidious Anaerobe (FAA) acrescido de ácido nalidíxico (0,01mg/mL) e 5% de sangue desfibrinado de cavalo. Esses meios de cultura foram, então, incubados em anaerobiose (90 % N₂ + 10% CO₂), a 37°C, por 14, 4, 4 e 14 dias, respectivamente.

Após o isolamento dos microrganismos e obtenção de cultura pura, foram realizadas as análises morfofocelar (coloração de Gram) e morfofocelar dos mesmos, além do teste respiratório, para caracterizar o relacionamento dos diferentes microrganismos com o oxigênio atmosférico, e prova da catalase. A seguir procedeu-se a identificação ao nível de gênero e, quando possível, nível de espécie dos isolados por meio de "kits comerciais" Rapid ID 32A (BioMérieux), RapID ANA II e RapID NH System (Innovative Diagnostic Systems Inc.) e testes de fermentação de carboidratos, resistência a sais biliares, hidrólise da esculina, hemaglutinação de sangue humano, produção de gás, indol e sulfeto de hidrogênio.

Testes de susceptibilidade

Foram testadas as seguintes drogas antimicrobianas: amoxicilina (Bayer S.A., São Paulo, Brasil), amoxicilina/ácido clavulânico (Smithkline Beecham Brasil Ltda, São Paulo, Brasil), cefoxitina (Merck Sharp & Dohme, São Paulo, Brazil), imipenem (Merck Sharp & Dohme, São Paulo, Brasil) e penicilina G (Fontoura-Wyeth S.A., São Paulo, Brasil). Os pontos

críticos para as diferentes drogas seguiram as recomendações do NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS¹² (2000), sendo: amoxicilina, 16 µg/ml; amoxicilina/ácido clavulânico, 16/8 µg/ml; cefoxitina, 32 µg/ml; imipenem 8 µg/ml e penicilina G, 16 µg/ml. Empregou-se o método de diluição da droga em ágar, usando-se o ágar Wilkins-Chalgren suplementado com sangue desfibrinado de cavalo.

Um total de 187 isolados de bactérias anaeróbias obrigatórias e facultativas foram submetidos aos testes de susceptibilidade. Os seguintes microrganismos foram testados: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 13; *Actinomyces naeslundii*, 5; *A. israelii*, 3; *A. meyerii*, 2; *A. odontolyticus*, 1; *Actinomyces* sp., 6; *Bacteroides* sp., 11; *Enterobacter* sp., 2; *Enterococcus faecalis*, 2; *Eubacterium* sp., 5; *E. lentum*, 6; *E. nodatum*, 2; *Fusobacterium* sp., 12; *F. nucleatum*, 33; *F. necrophorum*, 2; *F. periodonticum*, 5; *Micromonas micros*, 8; *Peptostreptococcus* sp., 7; *P. anaerobius*, 3; *P. indolicus*, 1; *P. asaccharolyticus*, 2; *Porphyromonas gingivalis*, 8; *Prevotella* sp., 7; *P. intermedia-nigrescens*, 25;

Selenomonas sp., 9; e *Veillonella* sp., 7.

O inóculo bacteriano foi padronizado em 10⁵ células/botão, o qual foi transferido para as placas contendo os antimicrobianos e placas controle (sem droga) por meio de um replicador de Steers (Cefar Ltda, São Paulo, Brasil).

Empregou-se *F. nucleatum* ATCC 10953 e ATCC 25586, *E. lentum* ATCC 43055, *B. fragilis* ATCC 23745 e ATCC 25285, como cepas de referência para o controle de qualidade nos testes envolvendo anaeróbios e *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, e *E. faecalis* ATCC 29212 nos testes envolvendo microrganismos capazes de crescimento em aerobiose NCCLS¹² (2000). As placas testes e controles foram incubadas em anaerobiose (90 % N₂ + 10% CO₂) ou aerobiose, a 37°C, por 48 horas.

Após período de incubação, realizou-se a leitura dos resultados comparando o crescimento microbiano das placas testes com aqueles observados nas placas controles, sem drogas antimicrobianas. A concentração inibitória mínima foi definida como sendo a menor concentração da droga capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano.

Quadro 1. Percentual de resistência aos β-lactâmicos de 187 isolados bacterianos.

Microrganismos testados (n)	Drogas antimicrobianas				
	Amx	Amx/clav.	Cx	Im.	PeG
<i>A. actinomycetemcomitans</i> (13)	7,69	0,0	7,69	0,0	7,69
<i>Actinomyces</i> spp. (17)	11,76	0,0	0,0	0,0	11,76
<i>Bacteroides</i> sp. (11)	27,27	9,09	9,09	0,0	27,27
<i>Enterobacter</i> sp. (2)	100	100	100	0,0	100
<i>E. faecalis</i> (2)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Eubacterium</i> spp. (13)	7,69	0,0	0,0	0,0	7,69
<i>Fusobacterium</i> spp. (52)	7,69	0,0	1,92	0,0	7,69
<i>M. micros</i> (8)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Peptostreptococcus</i> spp. (13)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>P. gingivalis</i> (8)	12,5	0,0	0,0	0,0	12,5
<i>Prevotella</i> spp. (32)	21,88	0,0	26,25	0,0	25
<i>Selenomonas</i> sp. (9)	0,0	0,0	0,0	0,0	22,22
<i>Veillonella</i> sp. (7)	28,57	0,0	0,0	0,0	28,57

RESULTADOS

O quadro 1 traz os resultados referentes à susceptibilidade dos microrganismos testados aos antimicrobianos utilizados. A resistência a drogas β-lactâmicas foi mais elevada entre os anaeróbios Gram-negativos, particularmente *Prevotella intermedia-nigrescens* e *Veillonella* sp.

Com exceção de isolados do gênero

Bacteroides, todos os isolados resistentes à amoxicilina e outras drogas do grupo foram inibidos pela associação amoxicilina/ácido clavulânico, sugerindo a participação de β-lactamases no mecanismo de resistência a essas drogas.

DISCUSSÃO

A determinação dos padrões de

susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de infecções periodontais é de relevância para o emprego clínico dessas drogas, não apenas nas condições clínicas em que o emprego desses fármacos se faz necessário, como em Periodontia, mas principalmente quando se verifica que os microrganismos mais freqüentemente isolados das infecções de cabeça e pescoço, incluindo abscessos periapicais, anginas e celulites, residem no biofilme microbiano subgingival.

A utilização de drogas antimicrobianas no tratamento das infecções de cabeça e pescoço por vezes esbarra na problemática da seleção de microrganismos multiresistentes aos fármacos mais freqüentemente empregados (Walker et al¹⁹ 2004). Contudo, para a estabilização das condições periimplantares e periodontais não existe a necessidade de eliminação completa da maioria dos microrganismos envolvidos com essas patologias e, como as mesmas são conseqüências de inter-relações ecológicas que acabam por levar ou não a perda de tecido periodontal ou periimplantar, o controle dos grupos microbianos mais relevantes, como os anaeróbios Gram-negativos, pode levar ao controle dos demais patógenos que possuem interdependência metabólica (Lakhssassi et al⁷ 2005).

No tratamento das infecções anaeróbias mistas, como as periodontopatias e as infecções periimplantares, por vezes são empregadas drogas do grupo dos β -lactâmicos, além de nitroimidazóis, macrolídeos, lincosaminas e tetraciclina (Listgarten et al⁸ 1993; Herrera et al⁵ 2000; Needleman et al¹³ 2000). Contudo, a resistência de microrganismos anaeróbios obrigatórios e facultativos aos antimicrobianos vem sofrendo uma expansão significativa (Baumgartner & Xia¹ 2003), o que torna crítico os hábitos de prescrição tradicionais, sem a realização de exames laboratoriais capazes de determinar a sensibilidade microbiana aos antimicrobianos.

As drogas β -lactâmicas são as mais utilizadas no tratamento das infecções odontogênicas em função de seus bons resultados clínicos associado a sua pequena toxicidade. Contudo, no tratamento das infecções periimplantares e periodontais, seu uso como monoterapia medicamentosa é comprometido em função da presença de bactérias Gram-

negativas resistentes a essas drogas, as quais representam parcela significativa da microbiota dos sítios periodontais afetados. Essa resistência geralmente se manifesta pela produção de enzimas capazes de degradar essas drogas (Tinoco et al¹⁶ 1998; Mättö et al⁹ 1999; Lakhssassi et al⁷ 2005) e gêneros anaeróbios como *Fusobacterium*, *Prevotella* e *Porphyromonas* geralmente são os principais produtores das mesmas (Gaetti-Jarim et al³ 1996; Nyfors et al¹⁴ 1999; Herrera et al⁵ 2000).

Os resultados do quadro 1 estão de acordo com esses conceitos, visto que resistência à maioria dos β -lactâmicos testados parece ser uma característica de várias espécies bacterianas, em particular de espécies dos gêneros *Prevotella* e *Veillonella*. A maior resistência de *Prevotella* spp, em comparação com os anaeróbios do gênero *Porphyromonas*, também foi observada por Lakhssassi et al⁷ (2005), embora os valores de resistência a essas drogas tenham se mostrado mais elevados no presente estudo do que aqueles evidenciados por esses autores.

Desde que a associação amoxicilina / ácido clavulânico foi eficaz sobre a quase totalidade dos isolados resistentes aos demais β -lactâmicos, como também observado por outros autores (Mättö et al⁹ 1999), pode-se sugerir que o mecanismo de resistência a esses fármacos se deu pela produção de enzimas inativadoras. Em bactérias anaeróbias, principalmente as Gram-negativas, essas β -lactamases possuem atividade sobre penicilinas e cefalosporinas, de forma que deveria-se esperar que parte dos microrganismos resistentes às penicilinas também o fossem às cefalosporinas, como observado no quadro 1.

Esse fenômeno restringe a possibilidade de empregar a cefoxitina e as demais cefalosporinas em infecções em que o paciente apresenta história de uso prévio de penicilinas. Por outro lado, a eficiência dos carbapenêmicos como o imipenem sobre essas bactérias destaca mais uma vez a necessidade de se deixar esse grupo de drogas apenas para uso em infecções sérias, em que o paciente pode vir a ter comprometimento sistêmico.

Os resultados suportam a idéia de que o ácido clavulânico, um β -lactâmico destituído de atividade antimicrobiana, mas capaz de inibir a ação de uma extensa classe de β -lactamases, e suas associações com outras drogas β -

lactâmicas podem constituir importante opção de prescrição, particularmente quando o paciente possui história prévia de utilização de drogas desse grupo nos meses anteriores. A resistência de microrganismos do gênero *Bacteroides* à associação amoxicilina/ ácido clavulânico (Nakano & Ávila-Campos¹¹ 2004), e de *Enterobacter* sp. pode estar associada à produção de β -lactamases que não possuem afinidade pelo clavulanato ou mesmo a impermeabilidade bacteriana a essa classe de drogas, mas em função do pequeno número de isolados testados não se pode determinar com segurança a relevância terapêutica do fenômeno.

CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a resistência aos antimicrobianos, entre os anaeróbios obrigatórios, mostra menor eficácia para o emprego de β -lactâmicos como monoterapia medicamentosa em Periodontia e Implantodontia, preferindo-se as associações dessas drogas com inibidores de β -lactamases ou outros antimicrobianos, no controle das populações microbianas associadas às periodontopatias e patologias periimplantares de natureza infecciosa.

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the susceptibility to isolated microorganisms of the periodontal and periimplantar infections to β -lactams. It was tested the drugs such as: amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, cefoxitin, imipenem, and penicillin G. A total number of 187 isolated obligatory and facultative anaerobic bacteria were submitted to susceptibility tests. The bacterial inoculum was standardized to 10^5 cells/spot, which were transferred to the agar medium by mean a Steer's replicator (Cefar Ltd, São Paulo, Brazil). The results has shown a significant bacterial resistance to amoxicillin, penicillin G, while cefoxitin and amoxicillin/clavulanic acid presented a higher antimicrobial activity.

UNITERMS

Microbiology, Periodonty, Antimicrobials.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Baumgartner JC, Xia T. Antibiotic susceptibility of bacteria associated with endodontic abscesses. *J Endod* 2003;29(1):44-7.
2. Dörfer CE. Antimicrobials for the treatment of aggressive periodontitis. *Oral Diseases* 2003;9(suppl 1):51-3.
3. Gaetti-Jardim Jr., Zelante F, Ávila-Campos MJ. Oral species of *Fusobacterium* from human and environmental samples. *J Dent* 1996;24:345-8.
4. Heitz-Mayfield LJA, Lang NP. Antimicrobial treatment of peri-implant diseases. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2004;19(suppl):128-39.
5. Herrera D, Van Winkelhoff AJ, Dellemijn-Kippuw N, Winkel EG, Sanz M. Beta-lactamase producing bacteria in the subgingival flora of adult patients with periodontitis: a comparison between Spain and Netherlands. *J Clin Periodontol* 2000;27(7):520-5.
6. Jorgensen MG, Aalam A, Slots J. Periodontal antimicrobials-findings the right solutions. *Int Dent J* 2005;55(1):3-12.
7. Lakhssassi N, Elhajoui N, Lodter JP, Pineil JL, Sixou M. Antimicrobial susceptibility variation of 50 anaerobic periopathogens in aggressive periodontitis: an interindividual variability study. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:244-52.
8. Listgarten MA, Lai CH, Young V. Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *J Periodontol* 1993;64:155-61.
9. Mättö J, Asikainen S, Väisänen, M-L, Von Troil-Lindén B, Könönen E, Saarela M, Salinen K, Finegold S, Jousemies-Somer H. β -lactamase production in *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, and *Prevotella pallens* genotypes and in vitro susceptibilities to selected antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents Chemother* 1999;43(10):2383-8.
10. Mombelli A, Feloutzis A, Brägger U, Lang N. Treatment of peri-implantitis by local delivery of tetracycline. *Clin Oral Impl Res* 2001;12:287-94.
11. Nakano V, Avila-Campos MJ. Survey of antimicrobial susceptibility patterns of the bacteria of the *Bacteroides fragilis* group isolated from the intestinal tract of children. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(3):319-24.
12. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. NCCLS documents M7-A5, M2-A7, table M100S10. Fifth Edition, 2000.
13. Needleman IG, Collins AM, Moles DR. Periodontal flap surgery with 25% metronidazole gel. Clinical outcomes. *J Clin Periodontol* 2000;27:187-92.
14. Nyfors S, Könönen T, Takal A, Jousemies-Somer H. Beta-lactamase production by oral Gram-negative species in infants in relation to previous antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(7):1591-4.
15. Roos-Jansaker AM, Renvert S, Egelberg J. Treatment of peri-implant infections: a literature review. *J Clin Periodontol* 2003;30:467-85.
16. Tinoco EMB, Beldi MI, Campedelli F, Lana M, Loureiro CA, Bellini HT, Rams TE, Tinoco NMB, Gjerme P, Preus HR. Clinical and microbiologic effects of adjunctive antibiotics in treatment of localized juvenile periodontitis. A controlled clinical trial. *J Periodontol* 1998;69:1355-63.
17. Van Winkelhoff AJ, Goené DH, Benschop C, Folmer T. Early colonization of dental implants by putative periodontal pathogens in partially edentulous patients. *Clin Oral Impl Res* 2000;11:511-20.
18. Van Winkelhoff AJ, Winkel EG. Microbiological diagnostics in periodontics: biological significance and clinical validity. *Periodontology* 2000 2005;35:40-52.
19. Walker CB, Karpinia K, Baehni P. Chemotherapeutics: antibiotics and other antimicrobials. *Periodontology* 2000 2004;36:146-65.

AUTOR RESPONSÁVEL

Sérgio Ricardo Oliveira
e-mail: sr@netsite.com.br

Recebido para publicação: 30/03/2006
Aceito para Publicação: 08/06/2006



Everaldo José de Oliveira
Especialista em Prótese Dental (UFU-MG)
Mestre em Realização Oral (UFU-MG)
Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia de Anápolis



Gisela de Martins S. Pina
Especializanda em Prótese Dental (AORP)
Professora Assistente da Faculdade de Odontologia de Anápolis



Gisele Araújo Elias
Especialista em Prótese Dental (ABO-GO)
Especialista em Implantodontia (ABENO-SP)
Mestre em Realização Oral (UFU-MG)
Professora Adjunta da Faculdade de Odontologia de Anápolis



Júlio César Arantes
Especialista em Periodontia (FOA-RJ)
Mestre em Periodontia (UERJ)
Professor Adjunto da Faculdade de Odontologia de Anápolis

Odontologia Especializada

- ✓ Prótese Dental
- ✓ Tratamento de Disfunções Oclusais
- ✓ Restaurações Estéticas
- ✓ Clareamento Dental a laser
- ✓ Implantes Osseointegrados
- ✓ Próteses Sobre Implantes
- ✓ Prevenção e Tratamento das Doenças Periodontais
- ✓ Cirurgias Periodontais (Pré-protéticas, Enxertos e Estéticas)



Av. Senador José Lourenço n. 170 - Centro
Anápolis-GO- CEP 75010-020
(Próximo ao Colégio Galileu)
Fone/Fax: (62) 3321 4654
E-mail: everaldo@kfssystem.com.br

Construindo sorrisos a partir de uma Odontologia integral e integrada